575*, written on -

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

V

SCEAUX. — IMPRIMERIE CHARAIRE ET FILS.

S. FLEXNER

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Dr. med. F. CHRISTMANN
ZORNHOF-ZABERN
(Elsass.)

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

PUBLIÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

M. E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE

Et un Comité de rédaction composé de MM.

CHAMBERLAND, chef de service à l'Institut Pasteur,
Dr **GRANCHER**, professeur à la Faculté de médecine,
METCHNIKOFF, chef de service à l'Institut Pasteur.
NOCARD, directeur de l'École vétérinaire d'Alfort,
Dr **ROUX**, chef de service à l'Institut Pasteur,
Dr **STRAUS**, professeur à la Faculté de médecine.

CINQUIÈME ANNÉE

1891

Avec dix-neuf planches

PARIS

G. MASSON, ÉDITEUR
LIBRAIRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN
EN FACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

1891

R127

5me ANNÉE. JANVIER 1891. N° 1

MARINE BIOLOGICAL LABORATORY WOODS HOLL LIBRARY MASS.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU TÉTANOS

PAR MM.

L. VAILLARD, médecin major de 1re classe, professeur agrégé du Val-de-Grâce.

ET

H. VINCENT, médecin aide-major de 1re classe.

(TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE DU VAL-DE-GRACE.)

Le tétanos est produit par le développement constant, au niveau de la plaie provocatrice, d'un bacille spécial que Nicolaier a rencontré et décrit en 1884 dans le pus des animaux rendus tétaniques par l'inoculation de parcelles de terre. La spécificité du microbe de Nicolaier a été mise hors de doute par M. Kitasato[1], qui, après avoir isolé cet organisme du pus d'un homme tétanique ou d'animaux infectés avec de la terre, l'a cultivé le premier à l'état de pureté, et a montré que l'inoculation de ces cultures pures à diverses espèces animales provoquait sûrement tous les symptômes du tétanos spontané. Dans son important mémoire, M. Kitasato a fourni un procédé d'isolement facile du bacille tétanique, et définitivement fixé ses caractères morphologiques et quelques-unes de ses propriétés biologiques principales. Si ce travail n'a pas résolu toutes les questions que soulèvent l'étiologie et la pathogénie du tétanos, du moins il a

1. Kitasato, Le bacille du tétanos. *Zeitsch. f. Hyg.*, novembre 1889.

bien préparé le terrain pour l'étude expérimentale de la maladie; aussi est-il devenu le point de départ de recherches déjà riches en données intéressantes, et aussi de celles que nous publions aujourd'hui.

I

LE BACILLE DU TÉTANOS : SES CARACTÈRES ; SA CULTURE. SPORE.

Nicolaier a décrit l'agent pathogène du tétanos sous la forme d'un bacille long, grêle, dont une extrémité présente d'abord un renflement colorable et plus tard une spore brillante, aspect qui le fait ressembler à une épingle. M. Kitasato a complété cette description en montrant que cette manière d'être du bacille n'était cependant pas la seule, et que dans le pus des tétaniques, il pouvait aussi se présenter, avant la phase de sporulation, comme un bâtonnet mince, allongé, linéaire; cette particularité a expliqué pourquoi certains auteurs (Widenmann, Flugge) avaient cru que le bacille spécifique ne se trouvait pas d'une manière constante dans le pus de l'homme ou des animaux tétaniques.

Ce bacille ne se rencontre, en règle générale, qu'au niveau de la plaie, dans le pus, la couche superficielle de la poche purulente ou à son voisinage immédiat; il y est toujours mélangé à des organismes divers. Pour l'extraire à l'état de pureté, on peut recourir au procédé décrit par M. Kitasato, basé d'une part sur la résistance particulière de la spore du bacille tétanique à l'action de la chaleur, et d'autre part sur la qualité anaérobie du microbe. Le moyen que nous avons employé n'en diffère pas essentiellement.

Le pus ou le produit recélant le bacille du tétanos est ensemencé dans du bouillon de bœuf et cultivé dans le vide à la température de 38-39°. Rapidement le bouillon se trouble; après cinq ou six jours, il contient de nombreux bacilles en épingle au milieu d'autres microbes anaérobies, souvent aussi sporulés. Une très petite quantité de cette culture impure est soumise pendant une ou deux minutes, et en vase clos, à la température de 100° au bain-marie; ce chauffage, insuffisant pour détruire les spores du tétanos, tue la plupart des germes étrangers qui lui sont associés. Mise en bouillon et dans le vide, cette semence donne une culture où le bacille du tétanos est de beaucoup prédomi-

nant, parfois même pur. En répétant deux ou trois fois le chauffage et la culture dans les mêmes conditions, il est possible, sans autre moyen, d'obtenir le bacille du tétanos à l'état de pureté. Souvent cependant il reste mélangé au vibrion septique et à un bacille qui n'est pas sans offrir quelque analogie de forme avec celui de Nicolaier[1]. Pour le séparer, il convient alors de recourir aux milieux solides, à la gélatine, en suivant l'un ou l'autre des procédés décrits par M. Roux pour l'isolement des anaérobies, ou encore celui qui a été recommandé par M. Vignal dans le même but; ce dernier, commode et simple, nous a servi le plus souvent[2].

Les colonies du bacille tétanique apparaissent du 4e au 6e jour, suivant la température à laquelle se fait la culture. Ce sont, au début, de petites sphères nuageuses dont le centre est occupé par un point blanchâtre; la partie périphérique est formée de fins rayons, régulièrement disposés en auréole. Les jours suivants, l'auréole s'agrandit en divergeant, et l'ensemble de ses prolongements enchevêtrés donne une image qui rappelle le mycelium des moisissures; des bulles de gaz disloquent la gélatine au voisinage des colonies et, du 10e au 15e jour, la liquéfaction commence. Les bacilles prélevés dans les colonies naissantes n'offrent pas l'aspect caractéristique en épingle; ils se présentent comme des bâtonnets réguliers ou des filaments semblables à ceux du vibrion septique. A la température où la culture a été faite, la sporulation ne se produit, en effet, que tardivement, et le renflement qui la précède n'est pas encore formé au moment où les colonies sont utilisées.

Le bacille du tétanos est anaérobie; il se cultive dans le vide ou dans une atmosphère d'hydrogène. Si les milieux rigoureusement privés d'oxygène libre sont les plus appropriés à son développement, celui-ci n'exige cependant pas l'élimination complète de toute trace de ce gaz. On peut cultiver le microbe dans un vide relatif et l'habituer à croître dans un air à peine raréfié,

1. Ce bacille pseudo-tétanique présente, à un stade de son évolution, un renflement terminal bientôt occupé par une spore plutôt ovoïde qu'arrondie et qui n'est pas exactement terminale comme dans le cas du bacille de Nicolaier; le corps du bâtonnet est aussi plus épais, et sa mobilité est très marquée. La grande résistance de ses germes à la chaleur ne permet pas de l'éliminer par le seul chauffage. Cet organisme n'est point pathogène pour les animaux.

2. Vignal, *Ann. Inst. Past.*, 1887, p. 358.

sans que son activité pathogène paraisse grandement modifiée. Il se développe en vase ouvert dans des milieux disposés en couche épaisse, pourvu que l'accès de l'air soit assez limité. Ainsi on obtient des cultures abondantes et rapides sur les milieux, bouillon, gélatine, gélose, non purgés d'air, dans un tube étroit bien rempli et hermétiquement clos, ou bien dans une pipette ordinaire simplement étranglée au-dessus du niveau du liquide, et sans qu'il soit nécessaire d'obturer l'extrémité ouverte. Les cultures ainsi obtenues sont très actives. Toutefois, les cultures strictement anaérobies correspondent le mieux aux propriétés biologiques du microbe; ce sont celles que nous avons exclusivement utilisées.

Les milieux liquides, bouillons de bœuf, de veau, de poule, conviennent particulièrement à la culture du bacille du tétanos; ils se prêtent surtout bien à l'étude des produits élaborés par lui. Nos cultures les plus actives ont été obtenues dans le bouillon de bœuf ou de poule préparé avec une partie de viande pour deux parties d'eau.

Dans le bouillon, le bacille se développe rapidement à la température de 39°. Après 24 heures, le liquide est trouble et dégage par l'agitation de fines bulles de gaz; le trouble augmente par la suite, mais, vers le 15e jour, la culture se ralentit ou cesse, et il se forme un dépôt au fond du vase. Cette culture exhale une odeur pénétrante, très spéciale et qui se révèle à distance. Pendant son développement, le microbe a dégagé de l'acide carbonique et des traces de gaz hydrocarboné. La réaction du milieu est très alcaline.

Déjà, après 36 heures, on rencontre, à côté de bâtonnets réguliers, courts ou longs, de nombreux bacilles sporulés. Vers le 10e jour, on ne trouve guère plus que des bacilles avec spores: ce sont alors des bâtonnets grêles, en général courts, portant à une extrémité une petite sphère arrondie, de diamètre deux ou quatre fois plus large que le corps même du bacille, exactement terminale, d'un éclat brillant; c'est bien la forme d'une épingle.

Les conditions de température, compatibles avec la végétation du microbe, oscillent entre 14° et 43°.

Au-dessous de 14° la végétation ne se fait pas. De 18 à 20°, le développement est très lent et ne commence à devenir appréciable

qu'au bout d'une semaine. De 20 à 25°, la culture est déjà manifeste le 3e jour, mais la formation des spores est tardive. Dans les premiers jours, la culture est uniquement constituée par des bâtonnets réguliers, en général assez longs, parfois filamenteux et légèrement mobiles : on dirait du vibrion septique. Au 10e jour, les bacilles sporulés sont extrêmement rares ; après 20, 30 jours, les bâtonnets sont encore presque aussi nombreux que les bacilles à spore terminale. Les cultures faites à cette température sont presque inactives dans les cinq ou six premiers jours de leur développement; on peut en inoculer impunément des doses élevées ($^1/_3$, $^1/_2$ centimètre cube) à un animal très sensible comme le cobaye. Mais du 10e au 12e jour, leur activité devient grande ; il suffit alors de $^1/_{15}$ de centimètre cube, et moins encore, pour donner au même animal un tétanos intense, mortel en trois jours.

A la température de 38-39°, la végétation du microbe et la formation des spores sont très rapides ; alors aussi, presque dès les premières heures, la culture est très active. Un quinzième de centimètre cube d'une culture de 18 heures tue le cobaye en 50 ou 60 heures. Après deux jours, la même dose entraîne la mort en 30 heures ; au 4e jour, elle fait périr en 20 heures. Ultérieurement, l'activité des cultures augmente pour atteindre son maximun du 10e au 15e jour.

Le bacille du tétanos croît, même très rapidement, à la température de 42 ou 43°. Mais alors la plupart des bacilles ne produisent plus de spores ; ils apparaissent comme des bâtonnets granuleux et peu colorables, des filaments démesurément longs ou des bacilles présentant des formes renflées, arrondies, en poires, en fuseau, etc. Il ne s'est produit cependant aucune atténuation appréciable.

Les liquides organiques, comme l'albumine de l'œuf, l'humeur aqueuse, le sérum frais et liquide du sang de bœuf, de lapin, de cobaye, semblent peu favorables à la végétation du microbe. Lorsqu'on y transporte une semence prise en bouillon, la plupart des bacilles qui se développent ne sporulent pas et présentent des formes d'involution ; la culture est peu abondante, parfois à peine appréciable, et ne dégage aucune odeur ; elle n'en est pas moins très active.

La croissance du microbe est, au contraire, normale sur le sérum coagulé.

Les cultures faites dans le sang frais du lapin possèdent un grand pouvoir pathogène; elles donnent un tétanos mortel au lapin à la dose minima de $^1/_8$, $^1/_{15}$ de centimètre cube, alors que pour arriver à ce résultat avec la même semence entretenue en bouillon, il est nécessaire d'inoculer un demi ou un centimètre cube.

Les cultures en gélatine se font aisément sans recourir au vide ou au barbottage d'un courant d'hydrogène; les procédés simples décrits par M. Roux suffisent, et l'on obtiendra de beaux développements en ensemençant, dans un tube ordinaire, de la gélatine privée d'air par l'ébullition et disposée en couche de 10 à 12 centimètres d'épaisseur. Les caractères de la culture ont été bien décrits par MM. Kitasato, Sanchez Toledo et Veillon[1]. Celle-ci est formée par un nuage qui envahit toute la partie inférieure du cylindre de gélatine; la liquéfaction survient en général vers le 10e jour, et il se forme progressivement au fond du tube un dépôt floconneux de microbes, surmonté par une couche de gélatine claire et fluide. A son début, pendant sa période nuageuse, la culture n'exhale aucune odeur; elle est uniquement formée de bâtonnets, de filaments mobiles, et son activité est alors très peu marquée : on peut en inoculer une dose appréciable à un animal sensible sans provoquer aucun phénomène tétanique. Mais, lorsque la liquéfaction a commencé, les spores se forment, l'odeur caractéristique apparaît, et l'activité de la culture est grande.

Le bacille du tétanos se développe sur la gélose sans caractère spécial. Il croît difficilement sur la pomme de terre. Nous avons réussi une seule fois à l'obtenir sur ce milieu où il formait une couche humide, luisante, assez semblable à celle que donne le bacille typhique, composée de très longs bâtonnets sans renflement ni spore.

Le bacille est doué d'une légère mobilité lorsqu'il est à l'état de bâtonnet ou de filament; tout mouvement disparaît lorsque se produit le renflement terminal, précurseur de la spore.

Les cultures en bouillon et sur milieux solides conservent pendant très longtemps leur vitalité soit à l'étuve, soit à la température ordinaire, lorsqu'elles sont maintenues à l'abri de l'air;

1. Sanchez Toledo et Veillon, Rech. microbiol. et expérim. sur le tétanos. *Arch. de Méd. expérim.*, nov. 1890.

rajeunies, après plus de six mois, elles donnent un développement abondant et se montrent très actives.

Spore du bacille tétanique. — Les spores du bacille tétanique comptent parmi les plus résistantes à l'action de la chaleur. Chauffées en vase clos et en milieu humide, au bain-marie, elles supportent pendant six heures la température de 80°, et ne sont pas tuées par un séjour de une heure et même de deux heures à 90°. Elles résistent, sans rien perdre de leurs aptitudes, à la température de l'ébullition pendant 3 ou 4 minutes, mais sont détruites (non toujours cependant) après 5 minutes; jamais nous n'avons trouvé de spores vivantes lorsque la chauffe avait été prolongée au delà de 8 minutes.

Selon M. Kitasato, les spores desséchées conservent pendant des mois leur vitalité et leur virulence à l'air libre, dans de la terre abritée contre la lumière; il en serait de même, d'après MM. Sanchez Toledo et Veillon, lorsqu'elles sont exposées à la lumière diffuse. Il résulte, au contraire, de nos recherches, que les spores desséchées sont très sensibles à l'action de la lumière diffuse ou de la radiation solaire, lorsque celles-ci s'exercent en présence de l'air; elles subissent, en effet, des modifications plus ou moins profondes qui, pour se produire, n'exigent pas un temps très long : leur germination devient d'abord moins rapide et leur culture moins active, puis elles donnent naissance à des bacilles dénués de tout pouvoir pathogène, incapables de produire des spores et d'en former ultérieurement dans les cultures successives; enfin elles périssent après un délai qui n'a guère excédé un mois.

En juillet dernier, des spores provenant d'une culture en bouillon et desséchées sur du papier ont été exposées, en vase ouvert, à la lumière diffuse et au soleil quand il paraissait; pendant la durée de l'expérience, la température intérieure des vases ne dépassa pas 35°. Après 6 jours, ces spores ont donné une culture maigre, formée de bacilles sans renflement, définivement asporogènes et dénués d'activité. Après 12 jours, toutes les spores avaient péri.

Deux séries d'expériences ont donné des résultats identiques.

Une 3e expérience est faite en octobre avec des spores prélevées dans une culture en gélatine. Après 10 jours d'exposition à la lumière diffuse, au contact de l'air, et 46 heures d'insola-

tion (T^{re} maxima à l'intérieur des vases = 28°), ces spores ont donné des cultures très actives, formées de bacilles sporulés. Après 32 jours, sur lesquels on compta 60 heures d'insolation, la plupart des spores avaient péri; quelques-unes se développaient en donnant des bacilles granuleux, déformés, ressemblant souvent à des chaînettes de coccus, asporogènes et sans activité.

A l'abri de la lumière, l'action de l'air, pour être un peu plus lente, n'en est pas moins certaine. Des spores provenant d'une culture en bouillon sont desséchées sur du papier, puis incluses dans un flacon noirci que l'on fait traverser par un léger courant d'air. Déjà après 17 jours de cette aération, on obtint, par l'ensemencement du papier, des cultures inactives formées de bacilles asporogènes. Toutes les spores n'étaient pas également atteintes, car après 22 jours (l'expérience n'a pas été suivie au delà), une des cultures faites donnait quelques rares bacilles sporulés.

Ces résultats concordent d'ailleurs avec les faits assez nombreux où l'on a vu des terres ou des poussières tétanigènes perdre assez rapidement leur pouvoir infectieux, au contact de l'air et de la lumière diffuse. Il est intéressant de constater que, dans ces conditions, les spores donnent naissance à des bacilles bien différents des bacilles originels, et désormais incapables de produire des germes.

Tout autrement se comportent les spores, lorsque la lumière agit à l'abri de l'air. Après plus de deux mois sur lesquels on compte 59 heures d'insolation, les spores germent, il est vrai avec un retard, mais donnent des bacilles bien sporulés et très actifs. Quelquefois cependant, nous avons eu des cultures surtout formées de bacilles asporogènes.

On peut imaginer que, dans le sol, les spores du tétanos pourront trouver aisément des conditions très propices à une longue conservation; il n'en saurait être de même pour celles qui résident à la superficie. Nous avons extrait des terres de surface, par la culture, des bacilles absolument identiques au bacille du tétanos par leurs caractères morphologiques, faisant comme lui des spores rondes et terminales, mais dépourvues de pouvoir pathogène. S'agissait-il du bacille du tétanos modifié par les agents cosmiques? Cela nous a paru vraisemblable. Nous

avons essayé de lui faire récupérer l'activité perdue sans y réussir jusqu'ici[1].

II

INOCULATION DES CULTURES AUX ANIMAUX; RECHERCHE DU BACILLE TÉTANIQUE SUR LE CADAVRE.

L'inoculation des cultures pures du bacille tétanique détermine sûrement chez les animaux réceptifs tous les symptômes caractéristiques du tétanos spontané.

La souris blanche, le rat et le cobaye sont les animaux les plus sensibles à l'action du virus; le lapin l'est à un degré moindre. Le chien est très résistant. Le pigeon et surtout la poule peuvent supporter sans dommage des quantités très considérables des cultures les plus actives.

Une dose extrêmement faible de culture en bouillon ($^1/_{500}$ de centimètre cube et même moins) suffit pour donner à la souris et au cobaye un tétanos typique qui débute après une période d'incubation de 12 à 20 heures, et détermine la mort dans les 36 ou 40 heures qui suivent l'inoculation. Le lapin exige des doses plus fortes, variant, selon les sujets ou l'activité des cultures, de $0^{cc},5$ à $1^{cc},5$. Chez cet animal, la période d'incubation et la durée de la maladie sont toujours plus longues : les premiers symptômes n'apparaissent guère que du 2e au 3e jour, quelquefois même plus tard, du 6e au 8e jour; l'évolution des accidents est aussi moins rapide, et la mort ne survient que 3, 4 et même 10 jours après le début du tétanos.

L'injection sous la peau, dans les muscles, le péritoine, les veines ou sous la dure-mère, réussit également bien; l'inoculation reste sans effet lorsqu'elle est faite par la voie digestive. On peut encore donner le tétanos au cobaye en laissant tomber deux ou trois gouttes de culture sur une plaie cutanée du dos,

1. L'agent pathogène du tétanos, si répandu à la surface du sol et des plantes, serait peut-être rapidement détruit par les agents cosmiques, s'il ne trouvait dans son passage à travers le tube digestif des herbivores des conditions éminemment propices à son entretien et à sa multiplication, ainsi que l'ont établi MM. Sanchez Toledo et Veillon.

très minime comme étendue, et intéressant à peine les couches les plus superficielles du derme. Mais de ces modes d'infection, aucun ne paraît ni plus sûr ni plus sévère que l'inoculation sous la peau ou dans les muscles; les effets ne sont pas plus prompts ou plus intenses lorsqu'on dépose la culture sous la dure-mère après trépanation, et la dose nécessaire pour donner ainsi le tétanos n'est pas inférieure à celle qu'il faut injecter par la voie sous-cutanée.

Ainsi que tous les auteurs l'ont signalé, le tétanos expérimental commence toujours dans les régions du corps les plus immédiatement voisines du point inoculé, puis il s'étend aux membres correspondants, et enfin se généralise. Si l'inoculation est faite sous la peau de l'abdomen, le pleurosthotonos constitue le symptôme initial, auquel s'ajoute bientôt la rigidité du membre antérieur ou postérieur du même côté. Dans le cas d'une injection intra-musculaire, les muscles d'abord contracturés sont ceux qui ont reçu le virus; mais si la dose employée est extrêmement faible, les sympômes tétaniques peuvent rester strictement limités au membre ou au groupe de muscles intéressés par l'inoculation. En déposant une goutte de culture sur la conjonctive du cobaye, on obtient parfois une contracture isolée et durable de l'orbiculaire des paupières.

L'injection sous la dure-mère, après trépanation, provoque un tétanos qui, d'abord céphalique (trismus, opisthotonos, occlusion des paupières, sorte de rictus), devient ensuite rapidement général; il est d'emblée général, lorsque l'inoculation est faite par la voie péritonéale ou sanguine.

Suivant l'activité des cultures, la dose injectée ou la résistance des animaux, l'affection produite peut affecter la forme aiguë, rapidement mortelle, ou prendre des allures traînantes, chroniques et, après une durée de 10, 20, 30 jours même, aboutir soit à la guérison, soit à la mort[1]. Il existe généralement une

1. MM. Tizzoni, Cattani et Baquis pensent que le tétanos aigu et le tétanos chronique pourraient être produits par deux microbes voisins, mais différents. Dans deux cas de tétanos aigu chez l'homme, ils ont rencontré le bacille de Nicolaier dont les cultures donnaient aux animaux un tétanos aigu, tandis que chez un troisième malade atteint de tétanos chronique, ils n'ont trouvé qu'un bacille à spore ovale, presque terminale, distinct du précédent par ses cultures, et produisant chez les animaux des contractures locales et la mort en 15 ou 20 jours avec des symptômes de paralysie. D'où ils concluent : « Les deux formes cliniques, tétanos aigu ou chronique, que l'on observe chez l'homme, peuvent être attribuées à

relation entre la durée de l'incubation et la gravité des accidents qui vont suivre : plus la première est courte, plus aussi le tétanos est intense et rapidement mortel; lorsque, au contraire. l'apparition des accidents est tardive, l'évolution de la maladie devient plus lente et n'entraîne la mort qu'après 6, 8 ou 10 jours. Il n'est point rare, lorsque la période d'incubation dépasse 4 ou 5 jours chez le cobaye, et 8 jours chez le lapin, de voir les animaux prendre un tétanos chronique dont ils guérissent.

A l'autopsie des animaux qui succombent après l'inoculation des cultures pures sous la peau, on ne trouve aucune lésion au point où l'injection a été faite, sauf parfois une minime hypérémie, ou, plus rarement, un œdème léger et circonscrit du tissu conjonctif. Si l'inoculation a été faite dans la cavité péritonéale, il peut se produire une exsudation de sérosité sanguinolente. Les viscères ne présentent d'autre modification sensible qu'un état congestif lié à la gêne respiratoire qui précède la mort.

Il est extrêmement rare de trouver dans la région inoculée, par l'examen microscopique, les bacilles du tétanos ou leurs spores, même chez les animaux qui succombent dans un délai très court n'excédant pas 26 heures; lorsque la recherche est positive, c'est à peine si l'on en compte quelques unités sur un grand nombre de préparations. Mais, si on ensemence un lambeau de tissu conjonctif prélevé au même point, on obtient toujours une culture du microbe; il en est également ainsi dans les cas où la mort survient 3, 4 ou 8 jours après l'inoculation.

La recherche du bacille dans le sang ou les viscères par l'examen microscopique a toujours été négative; par le procédé des cultures, elle a fourni des résultats différents suivant le mode d'inoculation employé. Dans les cas où les animaux avaient suc-

l'une ou l'autre de ces espèces ou à l'atténuation du bacille de Nicolaier. » La deuxième hypothèse est plausible; la première manque de fondement. La maladie provoquée chez les animaux par le bacille à spore ovale et presque terminale des auteurs italiens ne rappelle que de fort loin le tétanos typique, si toutefois elle lui ressemble. D'autre part, les faits expérimentaux démontrent qu'avec une culture pure du bacille tétanique, on peut déterminer chez le lapin ou le cobaye soit la forme aiguë, soit la forme chronique du tétanos. La distinction introduite par Tizzoni, Cattani et Baquis, en tant du moins qu'elle vise l'intervention de deux microbes différents dans la pathogénie du tétanos, est superflue et très hypothétique.

combé à une inoculation sous-cutanée, l'ensemencement de grandes quantités du sang, du foie, de la rate, des reins, du cerveau, du bulbe, de la moelle épinière, recueillies à des périodes variables après la mort, est resté stérile ; une seule fois cependant, en utilisant la presque totalité du cerveau d'un cobaye, nous avons obtenu une culture du bacille. Lorsque la mort succédait à l'inoculation de grandes doses de culture dans les veines ou le péritoine, il était ordinaire d'avoir des ensemencements féconds avec des quantités copieuses soit de la moelle osseuse, soit du foie, de la rate, ou du cerveau ; jamais le sang ne nous a paru contenir le microbe du tétanos.

L'agent pathogène ne se dissémine donc pas dans l'organisme lorsqu'il a été déposé sous la peau, sous la dure-mère ou au milieu d'un muscle ; il n'envahit ni le sang ni les organes, et c'est très exceptionnellement qu'il peut être rencontré dans un viscère. Sa présence dans les organes après inoculation intra-veineuse ne saurait surprendre. Les constatations précédentes établissent d'autre part que, loin de se multiplier au point d'inoculation, les microbes y diminuent de nombre dans des proportions telles qu'il est presque impossible de les retrouver après la mort par le seul secours du microscope ; cependant ils ne disparaissent pas d'une manière complète et absolue, puisque la culture permet encore de les déceler.

Nous avons cherché à savoir si, dans la période qui s'écoule entre l'inoculation et l'apparition du tétanos, il ne se faisait pas, à un moment quelconque, une pullulation fugace du microbe dans la région infectée. Chez des lapins inoculés sous la peau avec une grande quantité de culture, nous avons examiné le tissu conjonctif à des heures variables après l'injection : déjà au bout de 8 ou 6 heures, le nombre des bacilles est très minime ; après 12 heures, ils sont représentés par quelques unités libres au milieu des éléments cellulaires ; après 24 heures, leur présence est douteuse, mais la culture les décèle. L'examen méthodique de l'humeur aqueuse, après inoculation dans la chambre antérieure de l'œil, donne des résultats sensiblement identiques. Il y a donc lieu de penser que les bacilles ne se multiplent pas dans le corps de l'animal, ni au point inoculé, ni ailleurs.

L'absence de généralisation du bacille spécifique chez les animaux inoculés avec les cultures pures concorde entièrement

avec les faits observés sur l'homme ou les animaux atteints de tétanos spontané; les organes de ces derniers ne contiennent, en effet, que très exceptionnellement l'agent pathogène. Mais tandis que, dans le cas de tétanos spontané ou provoqué par l'inoculation de la terre, le microbe végète dans la plaie provocatrice, aucune multiplication ne paraît se produire au niveau de la région inoculée avec les cultures pures. Enfin le pus ou les produits recueillis dans la plaie d'un tétanique sont inoculables aux animaux, sans qu'il soit possible cependant d'effectuer plus de deux ou trois passages; chez les animaux inoculés avec la dose de culture pure strictement suffisante, les produits recueillis après la mort, dans la région infectée, ne sont pas inoculables.

Ces faits, en apparence contradictoires, recevront ultérieurement leur explication.

III

LE POISON TÉTANIQUE.

Il est établi que chez l'homme ou l'animal, spontanément atteints du tétanos, l'agent pathogène ne se trouve constamment qu'au niveau de la lésion provocatrice; il ne pullule pas dans les organes. Pour expliquer comment une culture aussi restreinte dans une plaie souvent insignifiante peut déterminer les symptômes de la maladie, on a été conduit à supposer que le bacille tétanique sécrétait au foyer de sa végétation un poison extrêmement actif qui se répand dans l'organisme (Nicolaier, Rosenbach, Flügge, Brieger, Nocard, etc.).

L'existence de ce poison est facile à démontrer; à l'exemple de Knud Faber [1], il suffit de le chercher dans les milieux nutritifs où le microbe a vécu.

Si on filtre sur porcelaine une culture pure du bacille tétanique en bouillon datant de 18 ou 20 jours, on obtient un liquide privé de tout germe, dégageant l'odeur caractéristique, à réaction franchement alcaline, et d'une toxicité considérable pour les animaux. Inoculé à des lapins, cobayes ou souris, sous la peau, dans les muscles, la cavité péritonéale, le sang, sous la

1. Knud Faber, *Berl. Klin. Woch.*, 1890, nº 31. — Résumé d'un travail antérieur.

dure-mère, il détermine sûrement un tétanos typique, mortel, ne différant en rien de celui que provoque l'injection des cultures vivantes. La dose active de ce liquide peut être réellement infinitésimale. Un cent millième de centimètre cube donne le tétanos à la souris. Un cinq centième, un huit centième de centimètre cube produit chez le cobaye un tétanos mortel en 50 ou 60 heures ; il suffit même de un millième de centimètre cube pour tuer l'animal en trois jours.

Les effets sont nuls lorsqu'on fait pénétrer le liquide par la voie digestive.

Le produit de la filtration des cultures contient donc une substance chimique qui, en l'absence du microbe vivant, détermine chez les animaux une intoxication mortelle ; la maladie produite par la toxine seule, agissant à dose extrêmement faible, ne diffère en rien, ni par les symptômes, ni par l'évolution, de celle que provoque l'inoculation du bacille tétanique lui-même.

Le tétanos de l'homme et des animaux est, en réalité, comme l'avaient pensé les premiers observateurs, une intoxication causée par le poison que le bacille sécrète au foyer si restreint de sa culture ; de là ce poison se diffuse dans l'organisme. Sa diffusion est probablement très rapide. Si on injecte une goutte ou une fraction de goutte de liquide filtré vers l'extrémité terminale de la queue d'un rat, c'est-à-dire dans une région où le tissu conjonctif est très dense et peu propice à une prompte absorption, on peut, trois quarts d'heure après l'inoculation, sectionner l'organe à 2 ou 3 centimètres au delà du point infecté, sans que l'évolution ultérieure de la maladie soit sensiblement modifiée ; l'animal meurt presque aussi rapidement que le témoin.

Toutes les cultures en bouillon sont loin de donner des liquides d'une égale toxicité, lors même qu'elles sont faites avec une semence unique, et dans des conditions semblables d'anaérobiose, de température, de durée, etc. La composition du milieu nutritif influe sur la quantité ou l'activité du poison élaboré par les microbes, et ce ne sont pas toujours les cultures les plus luxuriantes qui fournissent la toxine la plus active. Les bouillons très nutritifs, additionnés de peptone, de glucose ou de maltose, conviennent le mieux à une pullulation rapide et abondante du bacille, mais la toxicité de ces liquides est notablement inférieure à celle des cultures moins prospères que l'on

obtient dans un bouillon de bœuf ou de poule préparé avec une partie de viande et deux parties d'eau. Dans le sang en nature et le sérum frais, après une végétation maigre et en apparence difficile, le microbe produit un poison d'une activité considérable.

On peut, par un artifice, augmenter d'une manière remarquable la toxicité des cultures en bouillon; il suffit d'utiliser ce fait que le microbe se développe facilement dans un milieu où une première génération a déjà vécu et élaboré son poison. Une culture en bouillon de bœuf peptonisé et glycosé à 1 0/0, datant de 20 jours, donne, après filtration, un liquide qui tue le cobaye à la dose minima de 1/150 de centimètre cube. L'ensemencement de bacilles jeunes dans ce liquide est suivi d'une culture très abondante; filtrée au 18e jour, elle tue le cobaye au 1/500 de centimètre cube. Dans le liquide ainsi obtenu, il n'existe plus de substances nutritives pour un nouveau développement du microbe, car l'ensemencement reste infécond; mais si on y ajoute une faible quantité de bouillon neuf (20 cc pour 350 cc de la culture ancienne), la troisième végétation est encore assez abondante. Les microbes toutefois sont restés en grande partie filamenteux ou présentent des formes d'involution; les spores sont rares. Cette culture filtrée au 16e jour donne un liquide qui tue le cobaye au millième de centimètre cube (peut-être même à dose moindre) et la souris au cent millième de centimètre cube.

La quantité de toxine contenue dans une si minime fraction du liquide filtré est difficile à apprécier; peut-être cependant les chiffres suivants en donneront-ils une idée approximative. Un centimètre cube de ce liquide si actif, évaporé dans le vide, donne un résidu sec de 0gr,040. Soumis à la calcination, ce résidu subit une perte de 0gr,025 représentant le poids de la matière organique. Si l'on admet, chose évidemment inexacte, que ces 25 milligrammes appartiennent intégralement à la toxine elle-même, il ressort que ce poids de matière organique permettrait de tuer mille cobayes au moins ou cent mille souris; la dose mortelle serait donc, pour un cobaye, de 0gr,000.025. et pour une souris de 0gr,000,000,25! Est-il besoin de dire que dans ces 25 milligrammes de matière organique entrent pour une très large part des substances étrangères au poison tétanique, et

dont l'une sera signalée ultérieurement. Combien, en vérité, doit être minime, si même elle est pondérable, la dose réelle de toxine capable de donner la mort! De tels chiffres serviront au moins à placer sous son vrai jour l'incroyable activité des poisons fabriqués par les microbes dans les milieux de culture artificiels, activité probablement inférieure encore à celle des substances qu'ils élaborent dans l'organisme malade.

Ajoutons aussi que la quantité de matière active dissoute dans un liquide filtré ne représente pas la totalité de la toxine sécrétée par le microbe dans la culture, car la porcelaine en a retenu une portion notable [1]. Peut-être serait-il plus exact de dire que les bacilles adhérents à la surface du filtre conservent dans leur protoplasma une quantité encore grande de toxine. Nous avons, en effet, des raisons de croire que la cellule microbienne garde dans son intimité même le poison élaboré, et qu'elle le cède au liquide ambiant par un phénomène de dialyse.

Quelle est la nature du poison tétanique? Est-il une ptomaïne, ou bien une de ces substances analogues aux diastases que les belles études de MM. Roux et Yersin sur la diphtérie nous ont fait connaître?

M. Brieger avait cru naguère pouvoir affirmer que le bacille du tétanos élaborait des *ptomaïnes* diverses. Opérant sur des cultures impures faites dans de la viande de bœuf, de la rate de mouton, de la cervelle hachée, il était parvenu à extraire, à l'état de chloroplatinates, plusieurs composés dont les bases recevaient le nom de *tétanine*, *tétanotoxine*, *spasmotoxine*, et qu'il considérait comme les agents de l'empoisonnement. En formulant, il y a quelques mois à peine, une opinion nouvelle sur la nature du poison tétanique, M. Brieger nous a dispensés de toute critique à l'adresse de ses premières recherches et de celles de ses imitateurs, Verrhoogen et Baert, qui, pour isoler le poison, commencent par le soumettre à une ébullition prolongée, moyen sûr de

1. Après avoir filtré une culture en bouillon, on soumet la bougie à un lavage prolongé afin d'entraîner la toxine qu'elle peut contenir dans sa cavité. On l'immerge ensuite pendant 12 heures dans 250 grammes d'eau stérile que l'on filtre sur la bougie après ce délai; l'eau ainsi recueillie renferme assez de substance active pour tuer le cobaye à la dose de 1/30 de centimètre cube. La bougie est de nouveau plongée dans 250 grammes d'eau stérile que l'on filtre 12 heures après; le produit de ce nouveau lavage tue encore le cobaye à la dose de 1/8 de centimètre cube.

le détruire. Dans le même ordre d'idées, MM. Kitasato et Weyl[1] ont décrit récemment les procédés compliqués qui leur ont permis d'extraire des cultures pures deux composés ptomaïques : l'un, un *chlorhydrate de tétanine* provoquant à la dose considérable de $0^{gr},05$ à $0^{gr},1$, chez la souris, des symptômes peu comparables à ceux du tétanos ; l'autre un *composé de tétanotoxine* qui tuait les souris avec des phénomènes paralytiques.

On conviendra qu'il y a loin du prétendu poison tétanique isolé par les deux auteurs précédents à la substance que contiennent les liquides de filtration, si active malgré son mélange, et tuant par tétanos typique à dose impondérable ; MM. Kitasato et Weyl l'ont d'ailleurs reconnu. Il est donc certain que les ptomaïnes signalées jusqu'à ce jour n'ont rien de commun avec le véritable poison tétanique.

Des travaux de MM. Roux et Yersin sur la diphtérie était résultée une orientation nouvelle pour les recherches sur les produits toxiques que sécrètent les microbes. Inspiré par ces notions, Knud Faber étudia les propriétés générales de la matière active contenue dans les cultures filtrées du bacille tétanique, et, bien qu'agissant sur des produits impurs, parvint à déterminer ainsi sa véritable nature ; il établit qu'à l'instar des venins, le poison tétanique demeure sans effet lorsqu'il est inuit par la voie digestive ; qu'un chauffage à 65° le détruit ; que par l'ensemble de ses propriétés biologiques il présente de grandes analogies avec la jéquiritine, les enzymes ou ferments inorganisés. Ultérieurement, MM. Brieger et Fränkel attribuent au poison tétanique la composition des matières albuminoïdes et lui donnent le nom de *toxalbumine*. Tizzoni et Cattani essayent d'isoler ce poison, sans y parvenir, mais de leur étude intéressante ils concluent également à sa nature albuminoïde et à son analogie avec les zymases ou ferments solubles.

Nos recherches, inspirées aussi par celles de MM. Roux et Yersin, établiront combien est étroite la parenté qui relie le poison de la diphtérie à celui du tétanos ; elles confirmeront l'opinion émise par Knud Faber, Tizzoni et Cattani sur la nature diastasique probable de ce dernier.

La substance toxique contenue dans les cultures du tétanos

1. Kitasato et Weyl, *Zeitsch. f. Hyg.*, 1890.

est modifiée ou détruite par l'action de températures n'excédant pas 65°. Un liquide filtré qui tue rapidement le cobaye au 1/200 de centimètre cube, est considérablement atténué lorsqu'on le chauffe, en vase clos, pendant 40 minutes à 60°, ou 20 minutes à 62°; injecté au cobaye à la dose énorme de un demi-centimètre cube, il tue l'animal en 4 ou 5 jours. Un chauffage de 30 minutes à 65°, en vase clos, le rend inactif; les cobayes auxquels on en injecte un centimètre cube, et plus, n'éprouvent aucun trouble immédiat ou consécutif.

Conservé en vase clos, à l'abri de l'air et de la lumière, le liquide filtré garde pendant longtemps toute son activité ; après quatre mois son pouvoir toxique est égal à ce qu'il était au moment de la filtration.

Exposé à l'air, en couche mince, dans un matras Pasteur, il perd de son activité, après un mois, et tue avec un long retard lorsqu'on l'injecte à la dose minima. Cette action de l'air est plus rapide et plus profonde lorsqu'elle s'exerce à la lumière solaire. Un liquide qui tue le cobaye au 1/200 de centimètre cube est inclus, en couche de un centimètre d'épaisseur, dans un vase conique à large ouverture, simplement fermé par un tampon de ouate. Après sept jours d'exposition à la lumière diffuse, sur lesquels on compte 32 heures d'insolation (température maxima de l'intérieur des vases 34°), ce liquide se montre inactif lorsqu'on l'inocule à la dose de 1/4 de centimètre cube à un très jeune cobaye. Le même liquide exposé à la lumière diffuse et solaire, mais en tube clos et sans air, n'avait sensiblement rien perdu de son activité première après 14 jours, dont 50 heures d'insolation.

L'acidification du liquide au moyen de l'acide tartrique ne modifie pas son pouvoir toxique.

Évaporé dans le vide, sur l'acide sulfurique et à la température ordinaire, le liquide filtré laisse un résidu brun, amorphe, conservant l'odeur propre aux cultures, et extrêmement toxique. L'alcool à 90° dissout une très faible quantité de ce résidu et laisse, après évaporation, une substance blanc grisâtre, qui exhale une odeur vireuse rappelant celle des vieilles pipes, et dont une partie cristallise à l'air. La substance soluble dans l'alcool n'a pas de propriétés toxiques : l'extrait alcoolique fourni par cinq centimètres cubes d'un liquide extrêmement actif a pu être injecté en totalité sous la peau d'un cobaye sans que l'animal en ait

ressenti le moindre dommage. Le poison tétanique est donc insoluble dans l'alcool.

La partie du résidu que l'alcool n'a pas dissoute se présente, après dessiccation, sous forme de masses amorphes, ambrées, inodores, très solubles dans l'eau ; inoculée au cobaye, elle lui donne un tétanos typique et mortel. L'alcool la précipite de sa solution aqueuse sous forme de flocons grisâtres.

La substance active contenue dans le résidu, dialyse avec une certaine lenteur[1].

On ne peut qu'être frappé des analogies qui existent jusqu'ici entre les caractères du poison diphtéritique et ceux de la toxine du tétanos ; cette ressemblance s'affirme encore par un autre trait commun.

Comme le poison diphtéritique et comme les diastases, la toxine du tétanos a la propriété d'adhérer à certains précipités que l'on produit dans le liquide où elle est contenue, C'est ainsi que les précipités de phosphate de chaux ou d'alumine entraînent, mais en partie seulement, cette substance active. Insérés sous la peau des cobayes, après avoir été soigneusement lavés à l'eau distillée stérile, ces précipités déterminent un tétanos intense, typique, mortel en 30 ou 36 heures; un volume du précipité encore humide, égal à celui d'une tête d'épingle, suffit pour obtenir ce résultat. Cependant le phosphate de chaux ou l'alumine n'a pas dépouillé le liquide, sur lequel on opère, d'une grande quantité de sa toxine, car après six précipitations successives, il reste encore très actif.

1. Un gramme de résidu, encore humide, provenant d'un liquide très actif, est dilué dans 26 centimètres cubes d'eau distillée stérile que l'on place dans le vase extérieur d'un appareil à dialyser. Sur le dialyseur, on verse 6 centimètres cubes d'eau distillée qui serviront pour les inoculations à faire. Le tout est recouvert d'une cloche et mis à la glacière. A des intervalles différents, on prélève de l'eau contenue dans le dialyseur pour l'injecter à la dose toujours égale de $^1/_5$ de centimètre cube sous la peau de l'abdomen de cobayes ; les résultats des inoculations successives ont été les suivants :

Après 4 heures.....	Effet nul.
Après 20 heures.....	Pleurosthotonos apparaissant au 4e jour; pas d'autres symptômes tétaniques. Guérison.
Après 40 heures.....	Pleurosthotonos le 3e jour qui suit l'inoculation, puis tétanos de moyenne intensité; guérison après 12 jours.
Après 3 jours.....	Pleurosthotonos survenant le 2e jour; tétanos généralisé. Mort le 7e jour.
Après 5 jours.....	Début du tétanos le 2e jour ; tétanos généralisé ; mort le 7e jour.
Après 7 jours.....	Tétanos généralisé débutant le 2e jour; mort le 10e jour.
Après 12 jours.....	Tétanos généralisé ; mort le 5e jour.

Desséchés dans le vide, les précipités gardent pendant long temps leur toxicité; le poison qu'ils ont retenu résiste mieux sous cette forme à l'action de l'air. Alors que le liquide filtré perd de son activité après un mois, et que, déjà avant ce délai, le précipité humide cesse d'être nocif, un précipité de phosphate de chaux desséché et conservé à l'air depuis plus d'un mois, a produit sur le cobaye un tétanos mortel en 5 jours.

La quantité de matière organique qui adhère au précipité est toujours extrêmement faible. Un milligramme du phosphate de chaux, dont il est parlé, est soumis à la calcination; la perte au rouge, représentant le poids de la matière organique, est inférieure à 3/10 de milligramme. Or, un demi-milligramme de ce même précipité suffit à donner au cobaye un tétanos mortel; la matière organique contenue dans ce poids minime est donc approximativement de $0^{gr}.00015$: encore est-il bien certain que cette matière est loin d'être la toxine pure.

Des faits exposés ci-dessus, il ressort que la toxine du tétanos ne présente aucun des attributs propres aux ptomaïnes, aux alcaloïdes; par l'ensemble de ses caractères, elle se rapproche du poison diphtéritique dont MM. Roux et Yersin ont établi les analogies frappantes avec les diastases ou encore les venins. Comme les diastases, le poison tétanique est détruit par la chaleur à des températures peu élevées, par l'action de l'air et de la lumière solaire; il est précipitable par l'alcool; il adhère à certains précipités. Comme les venins, il agit à dose impondérable et n'exerce aucun effet lorsqu'on l'introduit par les voies digestives. Ainsi que l'ont fait observer MM. Roux et Yersin, cette assimilation d'une toxine aux diastases ne vise point une communauté d'action chimique, car pas plus que le poison de la diphtérie, celui du tétanos ne digère l'albumine, la fibrine ou n'intervertit le sucre; elle tend seulement à établir que les substances toxiques élaborées par les agents pathogènes des deux maladies présentent un ensemble de propriétés appartenant aussi aux diastases, et que peut-être les unes et les autres ne diffèrent pas essentiellement.

Substance diastasique élaborée par le bacille du tétanos. Les cultures en bouillon du bacille tétanique contiennent une substance qui agit nettement à la manière des ferments digestifs. Si, dans un tube de gélatine ordinaire, on verse une petite quantité d'un

liquide provenant d'une culture de 15 à 20 jours filtrée sur porcelaine, on voit, après un délai variable selon la température à laquelle se fait l'expérience, le milieu primitivement solide, perdre sa consistance dans les parties en contact avec le liquide, se fluidifier ensuite graduellement, par tranches, quelquefois jusqu'à liquéfaction totale de la masse. Cette transformation se produit très lentement à la température de 15°; à 20-25°, elle n'exige guère que 15 à 20 jours pour s'accomplir, et devient extrêmement prompte à la température de 37°. Un mélange de deux parties de gélatine pour une partie de liquide filtré, mis en tube clos à l'étuve à 37°, cesse déjà de faire prise après 24 ou 36 heures, et reste ensuite définitivement fluide. Dans tous ces cas, le milieu nutritif garde sa limpidité et sa transparence ; il n'y a pas eu développement d'organismes auxquels on puisse imputer la liquéfaction observée : celle-ci a donc été produite par une véritable diastase que le microbe a élaborée dans sa culture.

L'intérêt du fait ne gît pas dans sa simple constatation; il était d'ailleurs à prévoir, puisque le développement du bacille sur la gélatine détermine la liquéfaction de ce milieu. Mais, il y avait lieu de se demander si la toxine et cette diastase qui liquéfie la gélatine n'étaient pas une seule et même substance; certaines particularités, du moins, semblaient l'indiquer. Nous possédons, en effet, plusieurs échantillons de bacilles du tétanos, entièrement dénués de virulence, qui croissent sur la gélatine sans la liquéfier, ou provoquent dans ce milieu une diminution de consistance à peine sensible : en perdant l'aptitude à fabriquer le poison, ces bacilles ont aussi perdu celle d'élaborer la diastase dont il s'agit. D'autre part, cette diastase, contenue dans les liquides filtrés, présente un ensemble de caractères communs à la toxine. Elle est modifiée ou détruite par des températures peu élevées : un chauffage de 15 minutes à 45° diminue déjà son action ; un chauffage de 15 minutes à 55° suffit à l'anéantir. Elle s'altère, puis perd totalement ses propriétés par l'exposition à l'air, à la lumière solaire. Un liquide filtré qui, après insolation au contact de l'air, est devenu inactif sur les animaux, est aussi incapable de liquéfier la gélatine ; par contre, un liquide qui, malgré 50 heures de l'action du soleil, mais à l'abri de l'air, a conservé tout son pouvoir toxique, reste également apte à fluidifier la gélatine. Enfin, de même que la

toxine agit également bien en milieu alcalin et en milieu acide, de même la diastase détermine la liquéfaction de la gélatine en milieu acide comme en milieu alcalin.

Ce parallélisme singulier entre les propriétés de la toxine et celles du ferment diastasique ne suffit pas à établir l'identité des deux substances ; il ne permet pas d'affirmer que toxine et diastase liquéfiante sont un seul et même corps, agissant comme poison dans l'organisme vivant et comme ferment digestif sur la matière organique morte. Le fait suivant semble bien l'établir. Un mélange de deux parties de gélatine pour une partie de liquide filtré, de virulence connue, est inclus dans une série de tubes clos que l'on porte à l'étuve à 37°. Si, à des jours différents, on recherche ce qu'il est advenu de la toxicité du mélange, on voit que, après 2, 4, 10 jours d'action sur la gélatine, le liquide ajouté a conservé son activité intégrale ; il tue à la même dose minima qu'auparavant. La quantité de toxine n'a donc pas diminué, ce qui, vraisemblablement, devrait être si toxine et diastase digestive étaient un seul même corps. On conçoit, en effet, que pendant l'action chimique sur la gélatine, il a dû disparaître une dose de diastase adéquate à la masse actionnée ; or cette disparition ne paraît en aucune façon porter sur la substance toxique.

Dans le cours de ce travail, il a été fait plusieurs fois allusion aux analogies que présentent la diphtérie et le tétanos ; les points de contact sont, en effet, si nombreux et si exacts entre les deux maladies qu'elles deviennent pour ainsi dire superposables. Toutes deux sont produites par un microbe qui se cultive en un point fort restreint de l'organisme, ne franchit pas les limites de la lésion locale, ne se généralise pas. Dans l'un et l'autre cas, l'agent pathogène élabore au foyer si limité de sa végétation une substance chimique d'une extrême activité qui se répand dans l'organisme, et que l'on retrouve aisément dans les cultures. Les deux microbes agissent donc à distance par l'intermédiaire d'un poison : la diphtérie et le tétanos sont éminemment des maladies d'intoxication. La toxine produite par le bacille du tétanos est exactement comparable à la toxine sécrétée par le bacille diphtérique : mêmes propriétés essentielles permettant de les assimiler aux diastases. La différence intervient dans l'action propre à chacune d'elles. Le poison diphtérique

exerce des effets immédiats ou à long terme; il peut agir sur des tissus d'ordre divers, appareil vasculaire, système nerveux, parenchymes, tissu conjonctif, tissu épithélial, et produire des lésions multiples (œdèmes, hémorragies, exsudats séreux, nécrose, néphrite, paralysies). Le poison tétanique, au contraire, ne paraît avoir que des effets immédiats qui se limitent au système neuro-musculaire.

Il nous serait difficile d'établir d'ores et déjà la physiologie pathologique de l'intoxication tétanique; nous nous bornerons à poser ici les questions qu'elle soulève. Si, chez un animal atteint de tétanos généralisé, on détruit graduellement la moelle par l'introduction d'une tige flexible dans le canal vertébral, on fait progressivement disparaître les contractures et les spasmes dans les membres innervés par les portions détruites de l'axe spinal. De même, si chez un animal dont le renflement lombaire a été préalablement détruit, on inocule dans les membres postérieurs une dose suffisante de toxine pour produire sûrement un tétanos généralisé, on voit les pattes postérieures rester flasques et inertes, alors que toutes les parties du corps en rapport avec la portion intacte du névraxe sont rigides et contracturées, et que le témoin inoculé de la même manière est atteint de tétanos général. Enfin le tétanos n'intéresse pas les groupes musculaires dont les nerfs ont été sectionnés. Ces expériences, renouvelées de celles qui ont conduit Magendie à établir la localisation élective de la strychnine sur la moelle épinière, semblent permettre la même conclusion en ce qui concerne la toxine tétanique. Mais il est d'autres faits que l'action exclusive du poison sur la moelle ne suffirait peut-être pas à expliquer. Tel est le début constant de la maladie par les muscles intéressés dans l'inoculation ou les plus voisins du point infecté; l'extension hémilatérale des symptômes du côté inoculé, et parfois leur limitation exacte à une moitié du corps. Telle est surtout la localisation absolue du tétanos à un groupe de muscles, lorsque la dose de toxine injectée dans un membre est extrêmement faible; on peut même déterminer la contracture isolée et durable d'un seul muscle. La toxine se comporte alors comme un poison musculaire.

IV

A L'ÉTAT DE PURETÉ, LE BACILLE TÉTANIQUE ET SES SPORES NE SE DÉVELOPPENT PAS DANS LES TISSUS VIVANTS ET SAINS. — CONDITIONS QUI EMPÊCHENT OU FAVORISENT LEUR DÉVELOPPEMENT.

I

Les cultures inoculées n'agissent que par la toxine qu'elles contiennent. — Tous les auteurs qui ont étudié jusqu'ici le tétanos expérimental obtenu par l'inoculation de cultures pures paraissent accepter que la maladie a pour cause la pullulation du bacille spécifique au point infecté. C'est ainsi que M. Kitasato s'est préoccupé de savoir si, et en combien de temps, l'agent pathogène produisait une substance toxique au sein de l'organisme vivant. Pour l'établir, il inocule plusieurs souris à la racine de la queue, résèque la région inoculée après 30 minutes, 1, 2, 3, 4 heures, etc., puis cautérise au fer rouge la plaie de section. Il observe alors que la souris dont la queue a été sectionnée 30 minutes après l'infection, survit seule; toutes les autres meurent tétaniques, et, en examinant au microscope la région inoculée, il constate que 8 ou 10 heures après l'inoculation on n'y trouve plus de bacilles. Ceux-ci, dit-il, disparaissent donc très rapidement lorsqu'ils sont injectés en cultures pures, mais, avant leur disparition, ils produisent un poison chimique très actif. Plus affirmatifs, MM. Sanchez Toledo et Veillon admettent que le bacille tétanique se développe d'une façon constante au point d'inoculation, qu'il peut même passer dans le sang de la circulation générale aux dernières heures de la vie.

Si la multiplication du bacille au point où il a été introduit est réelle, il faut convenir que cette culture est rapide et courte, puisque, de l'avis même des auteurs précédents, les microbes cessent d'être visibles après 8 ou 10 heures (Kitasato) et que, si on les rencontre, ils sont toujours en très petit nombre (Sanchez Toledo et Veillon). Nous avons très rarement réussi, après la mort de l'animal, à les déceler au point d'inoculation par l'examen microscopique. Il est même impossible de saisir

sur le fait une période de culture fugace, si tant est qu'elle existe.

Nous avons déjà mentionné que, chez le lapin, l'examen de la région inoculée, pratiqué pendant les heures qui suivent l'infection, ne montrait d'autre particularité que la diminution considérable et très rapide du nombre des bacilles. On peut s'en convaincre d'une manière plus facile et plus saisissante encore en recourant à l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil du lapin ou d'un animal très sensible, comme le cobaye. Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre animal, les résultats sont identiques : lorsque, à des périodes variables de 3 à 18 heures après l'inoculation d'une goutte de culture dans l'œil, on prélève de l'humeur aqueuse pour l'examiner, c'est à peine si, après 4 ou 6 heures, on y rencontre quelques microbes libres; passé le délai de 6 heures, il est généralement impossible d'en trouver, même lorsque l'inoculation a été faite avec une goutte d'une véritable purée de bacilles. Signalons, sans y insister pour l'instant, cette particularité remarquable, en contradiction formelle avec les faits connus pour les autres microbes pathogènes, que le bacille du tétanos ne se développe pas, durant la vie, dans l'humeur aqueuse d'animaux sensibles à la maladie.

Tout concourt à établir que, loin de se multiplier, le bacille disparaît rapidement de la région infectée; on sait d'autre part qu'il ne végète pas dans le sang et les viscères. Et cependant l'animal auquel on inocule une culture pure meurt du tétanos.

Étant donné l'extrême activité de la toxine contenue dans les cultures, on est conduit à penser que les animaux succombent alors aux effets du poison élaboré *in vitro* par le bacille, plutôt qu'aux conséquences du séjour et de la vie du microbe lui-même dans les tissus. La distinction est exacte, et, de plus, facile à vérifier. Une dose infinitésimale, 1/500, 1/1000 de centimètre cube de liquide filtré, privé de microbe vivant, provoque chez le cobaye un tétanos aussi meurtrier que celui qui succède à l'injection de doses cent ou deux cents fois plus grandes de culture intégrale; ne doit-on pas supposer que les doses de culture habituellement employées par les expérimentateurs renferment une quantité de toxine suffisante à elle seule pour tuer ? D'autre part, si on inocule simultanément des ani-

maux, les uns avec une culture ordinaire, les autres avec le produit de filtration de cette même culture, à dose égale, tous les animaux succombent dans un délai sensiblement le même et avec des symptômes identiques. Enfin, l'expérience précitée de M. Kitasato peut être rigoureusement reproduite en opérant, non plus avec une culture vivante, mais avec un liquide filtré. Deux lots de quatre rats blancs sont inoculés à la partie moyenne de la queue, l'un avec une culture en bouillon datant de trente jours, l'autre avec le liquide filtré de cette même culture ; la dose injectée est égale dans les deux cas (1/15 de centimètre cube). A trois rats de chaque lot on sectionne ensuite la queue au voisinage de la base et à des périodes variables après l'inoculation, 45 minutes, 2, 3 heures; le quatrième rat sert de témoin pour chacun des groupes. Tous les animaux succombent à un tétanos typique dont le début et l'évolution ne semblent guère influencés pas l'ablation plus ou moins précoce de l'organe infecté; cependant l'apparition du tétanos a été plus rapide et la mort plus prompte chez les rats inoculés avec la culture filtrée que chez les rats inoculés avec la culture vivante.

On peut donc supposer que, dans les conditions habituelles de l'expérimentation, c'est la toxine des cultures qui donne le tétanos et non celle que le microbe peut élaborer dans les tissus. La preuve qu'il en est ainsi, c'est que le microbe lui-même n'intervient pour rien dans la production de la maladie. En effet, si on inocule des cultures ne contenant pas de toxine parce que le bacille ne l'a pas encore sécrétée, le tétanos ne se manifeste pas. Nous avons déjà fait allusion à ce singulier résultat. Lorsque la culture du bacille s'effectue à une température de 20-22°, le microbe se développe assez bien, mais ne fabrique son poison que tardivement. On peut donc, en utilisant ces cultures à un moment convenablement choisi, disposer d'un microbe bien vivant, en voie d'active végétation, mais dégagé de toxine; lorsqu'on l'inocule à des animaux très sensibles comme le cobaye, à dose même considérable, l'animal ne présente ni immédiatement, ni ultérieurement aucun signe de tétanos. C'est ainsi que nous avons pu injecter à de jeunes cobayes 1/4, 1/3 de centim. cube d'une culture de 5 jours faite en bouillon à la température de 22°, et *très riche en bacilles*, sans déterminer aucun trouble appréciable; un demi-centimètre cube de la même culture a simplement produit une

raideur légère et fugace des muscles dorso-lombaires. De même l'inoculation de cultures en gélatine âgées de 5 à 6 jours et non encore liquéfiées, n'a provoqué aucun symptôme tétanique chez le cobaye. N'est-il pas surprenant de voir ce microbe pathogène n'exercer aucun effet sur l'organisme? La dose inoculée peut être considérable, le nombre des bacilles réellement prodigieux; de plus ceux-ci sont jeunes, en pleine voie de développement et cependant ils ne prospèrent point dans les tissus, ils disparaissent sans avoir eu le temps de sécréter leur toxine[1].

Le résultat est identique si on inocule des quantités, même très grandes, de spores sans toxine. Un centimètre cube d'une culture ne contenant plus que des bacilles sporulés peut être injecté sans dommage au cobaye, lorsque la culture a été préalablement chauffée à 65° pendant 20 minutes. Cette température rend la toxine inactive sans altérer les spores; ensemencées, elles germent et donnent un liquide très toxique : chez l'animal ces spores ne se développent pas.

Mais peut-être estimera-t-on que les spores n'évoluent pas parce qu'elles ont été affaiblies par le chauffage.

Au lieu de détruire la toxine au moyen de la chaleur, on peut l'entraîner par un lavage abondant et rapide à l'eau stérile qui a l'avantage de ne pas altérer d'une manière appréciable la vitalité des spores. Ainsi débarrassées de leur poison, ces spores ne donnent plus le tétanos lorsqu'elles sont introduites avec pureté dans l'organisme d'un animal sain.

On recueille par décantation la totalité du dépôt d'une culture dans 250^{cc} de bouillon, âgée de 20 jours, et dont l'activité est telle qu'il suffit de 1/400 de centimètre cube pour tuer un cobaye en 3 jours. Ce dépôt est soumis, à l'abri de toute contamination, à un lavage de 24 heures dans 6 litres d'eau stérile [2];

1. On ne saurait penser qu'il s'agit ici d'un microbe atténué par les conditions dans lesquelles s'est effectué son développement. Les cultures en bouillon ou en gélatine, qui se montrent inactives lorsqu'on les inocule au 5e ou 6e jour, deviennent très rapidement actives; au 10e jour elles tuent à la dose de 1/15 de centimètre cube, et sont encore plus toxiques au 15e ou 20e jour. Le microbe inoculé n'avait donc rien perdu de son aptitude à élaborer le poison.

2. Le procédé de lavage auquel nous avons eu recours est le suivant. Une bougie Chamberland est sectionnée à 3 ou 4 centimètres de son fond. Dans le culot ainsi obtenu et préalablement stérilisé, on introduit la culture ou le dépôt de culture, puis on le relie au moyen d'un embout et d'un tube épais en caoutchouc à la tétine d'une bougie ordinaire filtrant par pression. Grâce à ce dispositif, il est facile de laver la culture contenue dans le culot avec telle quantité que l'on voudra

après lavage il est récolté intégralement et délayé dans 4 cc d'eau également stérile. On obtient ainsi un liquide boueux, une véritable purée extraordinairement riche en microbes sporulés, puisqu'elle contient la totalité des bacilles qui se sont développés pendant 20 jours dans 250 cc de bouillon. Ces spores sont bien vivantes ; ensemencées, elles donnent rapidement une culture dont l'activité est grande, comme le démontre l'inoculation à l'animal. A des cobayes on injecte des doses variables de cette purée microbienne, allant jusqu'à 1/3 de centimètre cube, sans que les animaux présentent, soit immédiatement, soit par la suite, aucun symptôme de tétanos. Et cependant, dans la minime fraction de ce liquide que peut contenir une anse de platine, il existe une telle abondance de spores que l'on doit évaluer à des milliards le nombre de celles qui ont été introduites sous la peau de chaque animal. Les myriades de bacilles contenues dans le dépôt soumis au lavage avaient élaboré au sein de la culture une quantité de toxine suffisante pour donner le tétanos et la mort à 100,000 cobayes; la douzième partie des spores formées par tous ces microbes est injectée à un seul cobaye et ne réussit pas à sécréter la dose de poison suffisante pour le rendre malade. Peut-on fournir une preuve plus saisissante que les spores du bacille tétanique introduites seules, avec pureté, sous la peau d'un animal très sensible comme le cobaye sont incapables de germer et de provoquer la maladie, bien qu'elles soient placées dans les meilleures conditions d'anaérobiose! Cette résistance de l'animal a toutefois une limite, car si on lui inocule une dose équivalente au quart ou au huitième du dépôt recueilli, il succombe à un tétanos rapide.

Ainsi se trouve établie la part respective du microbe et de la toxine dans les effets consécutifs à l'inoculation des cultures pures. Le microbe ne se multiplie pas, il disparaît rapidement des tissus où on l'injecte. Mais la toxine qu'il avait élaborée an-

de l'eau pure débitée par la bougie supérieure, et cela à l'abri de toute impureté, et sans perte possible de microbes, puisqu'ils seront tous retenus sur les parois du filtre inférieur. Opérant avec le minimum de pression nécessaire à la filtration, on peut, en 18 ou 24 heures, faire passer 5 ou 6 litres d'eau sur le dépôt microbien ; un tel lavage est en général suffisant pour entraîner la presque totalité de la toxine que les microbes retiennent à leur entour ou dans leur intimité. Lorsque le lavage est terminé, la paroi intérieure du culot est tapissée par un enduit de bacilles qu'il est aisé d'enlever avec un pinceau stérile.

térieurement *in vitro* et que la culture inoculée renferme, est toujours prête à agir avec la rapidité qui lui est propre ; elle agit seule pour produire la maladie et la mort [1]. Une notion plus importante se dégage encore : le bacille tétanique ou ses spores, lorsqu'ils pénètrent seuls, même en quantité considérable, dans les tissus d'un animal sain, ne se développent pas et demeurent inoffensifs. On comprend dès lors la non inoculabilité des produits prélevés chez un animal rendu tétanique par l'injection de *cultures pures*.

II

Les recherches expérimentales entreprises jusqu'ici au moyen des cultures pures se réduisent donc à une étude sur les propriétés du poison tétanique ; elles ne fournissent aucun renseignement sur le mécanisme véritable de l'infection telle qu'elle s'observe dans les conditions naturelles. Bien différentes, en effet, sont les circonstances réalisées au laboratoire par l'inoculation des cultures, et celles que l'homme ou les animaux rencontrent lorsqu'ils contractent spontanément le tétanos. Dans le premier cas, on injecte simultanément le microbe et une dose de toxine suffisante pour tuer ; dans le second une plaie est souillée par des produits contenant des spores du bacille tétanique qui, avant de susciter la maladie, auront à germer et à sécréter le poison spécifique : les faits ne sont évidemment pas comparables.

1. Cette toxine peut être retrouvée, après la mort de l'animal, dans les humeurs et les tissus, mais seulement lorsque l'inoculation a été faite à dose copieuse. Avec $0^{cc},3$ de sérosité pleurale ou de sang recueillis sur un lapin qui avait succombé à l'inoculation de 1/2 centimètre cube de liquide filtré, M. Kitasato a pu donner le tétanos à des souris. De même M. Bruschessini, opérant encore avec la toxine seule (mention n'est point faite de la dose), a trouvé dans le sang, la moelle, les reins des lapins, une quantité suffisante de poison actif pour provoquer, par l'injection de ces produits, le tétanos chez d'autres lapins. Après l'inoculation aux cobayes d'une dose de toxine inférieure à 1/8 de centimètre cube, nous n'avons jamais pu déceler la présence du poison dans le sang ou les organes. — Les faits expérimentaux de MM. Kitasato et Bruschessini nous semblent en éclairer certains autres, ceux de MM.. Sanchez Toledo et Veillon, par exemple, qui ont réussi parfois à donner le tétanos en inoculant un fragment assez volumineux du tissu conjonctif excisé au point d'inoculation, une grande quantité de sang, la presque totalité du foie, de la moelle, etc., provenant d'animaux tués par l'injection de cultures à dose malheureusement non précisée.

Or il a été démontré que si l'on introduit avec pureté, dans des tissus d'un animal sain, des bacilles jeunes ou des spores privés de toxine, ces bacilles et ces spores ne produisent pas la maladie. Cependant il s'agit, en l'espèce, d'animaux comme le cobaye qui contractent facilement le tétanos lorsqu'on les infecte avec de la terre ou des produits recueillis dans la plaie d'un tétanique, lesquels sans nul doute ne comportent jamais une proportion de germes équivalente à celle dont il a été fait usage dans les expériences précédentes.

Il doit donc exister des conditions saisissables qui favorisent ou empêchent la multiplication de l'agent pathogène au point où il pénètre. C'est ce que l'on peut établir.

Lorsqu'on inocule avec pureté à un cobaye 1/4 ou 1/3 de centimètre cube du liquide, riche en bacilles sporulés, mais sans toxine, dont il a été parlé plus haut, l'animal ne prend pas le tétanos. On peut provoquer la maladie avec une dose beaucoup moindre. Si, après avoir mélangé 1/15 de centimètre cube du liquide précédent à 1/4 de centimètre cube d'une solution d'acide lactique au cinquième, on injecte le tout dans les muscles de la cuisse d'un cobaye, l'animal devient tétanique : les symptômes débutent par la patte inoculée, s'étendent rapidement aux autres membres, aux muscles de la nuque, et la mort survient le troisième jour après l'inoculation.

Chez le lapin l'effet sera le même. Pour donner le tétanos à cet animal avec des *cultures pures* très actives, il est généralement nécessaire d'inoculer des doses variant de 1/2 à 1 centimètre cube; des quantités considérables de microbes sans toxine n'exercent sur lui aucune action. Mais on provoque la maladie en associant 1/8 de centimètre cube du liquide contenant les microbes sans toxine à 1/4 de centimètre cube de la solution lactique. L'injection étant faite dans un muscle de la cuisse, le tétanos débute au troisième ou quatrième jour par le membre inoculé, se généralise, et tue vers le huitième jour après l'injection.

L'acide lactique peut être remplacé par la tri-méthylamine à la dose de 4 gouttes; le lapin prend alors un tétanos très violent, mortel en 8 jours. D'autres substances agiraient sans doute dans le même sens.

Un simple traumatisme suffit à produire des effets identiques. A un cobaye, on fait une forte contusion d'un muscle de la

cuisse (pression énergique à l'aide d'une pince), sans plaie extérieure, et au point meurtri on injecte 1/15 de centimètre cube du liquide renfermant des spores sans toxine. 48 heures après, le tétanos débute par le membre traumatisé, et l'animal meurt à la fin du troisième jour.

Ainsi donc, comme dans les expériences bien connues de MM. Roux et Nocard sur le virus atténué du charbon symptomatique, l'action sur les tissus d'un agent chimique (acide lactique, tri-méthylamine), ou d'un traumatisme banal, permet l'infection par des spores qui, injectées seules ou dans un muscle sain, eussent été incapables de produire la maladie.

L'association du *microbacillus prodigiosus* aux spores du bacille tétanique n'est pas moins propre à favoriser l'infection. Un cobaye reçoit sous la peau de l'abdomen un mélange de 1/15 de centimètre cube du liquide renfermant des bacilles sporulés sans toxine, et de 0cc,5 d'une culture de *microbacillus prodigiosus* en bouillon datant de un mois : 32 heures après débute un tétanos qui se généralise avec une extrême violence et provoque la mort dans la 50e heure qui suit l'inoculation.

La culture du *microbacillus prodigiosus* a-t-elle agi par les produits solubles qu'elle renferme ou par les cellules vivantes du microbe ? Cette dernière hypothèse paraît la plus plausible. En effet, si on associe les spores du tétanos à 0cc,5 du liquide résultant de la filtration sur porcelaine de la même culture du *microbacillus prodigiosus*, l'injection de ce mélange au cobaye n'est pas suivie de tétanos. De même, si on emploie une quantité égale de cette culture chauffée pendant 4 minutes à 100° ou bien à 60° pendant une heure. Il y a donc, dans les cultures du *mic. prodigiosus*, un agent que le filtre arrête, que la chaleur détruit, et qui, ajouté aux spores du tétanos, facilite leur pouvoir pathogène. Cet agent paraît être le microbacille lui-même, comme l'indique l'expérience suivante. Une culture du *mic. prodigiosus*, âgée de 3 jours, est lavée sur porcelaine par deux litres d'eau stérile, suivant le procédé déjà mentionné pour les cultures du tétanos ; les produits solubles que le microbe a sécrétés sont ainsi éliminés. On mélange ensuite un peu de l'enduit retenu par le filtre à des spores tétaniques sans toxine (1/15 de centimètre cube), et le tout est injecté sous la peau d'un cobaye ; soixante-douze heures après apparaissent les premiers signes d'un tétanos qui se

généralise et tue l'animal le 6e jour après l'inoculation. L'évolution de la maladie est ici moins rapide que dans le cas où le mélange a été fait avec une culture intégrale du *mic. prodigiosus*, ce qui conduit à supposer que les substances élaborées par le microbe, la tri-méthylamine surtout, jouent aussi un rôle pour favoriser l'injection tétanique ; il n'en ressort pas moins avec évidence que l'action du micro-bacille seul, dégagé de tout produit de sécrétion, suffit à produire les mêmes effets. Une conclusion s'impose donc : seules, les spores du tétanos ne pouvaient germer ; accouplées à un microbe banal, elles végètent et provoquent la maladie.

Des cobayes et des lapins témoins ont été toujours inoculés avec des doses supérieures du même liquide riche en spores sans toxine ; ils n'ont présenté aucun signe de tétanos et restent encore bien portants après plusieurs mois.

L'expérience relatée en dernier lieu laisse déjà soupçonner le rôle important qui peut être dévolu aux associations microbiennes dans la pathogénie du tétanos spontané ; les faits suivants l'établiront sans conteste.

Dans une logette creusée aux dépens du tissu cellulaire sous-cutané de la région abdominale chez le cobaye, on introduit une petite boule de ouate stérilisée qui a été imprégnée de spores sans toxine (1/30 de centimètre cube de liquide employé). La plaie, non suturée, est laissée exposée aux souillures extérieures, ou bien, sans asepsie préalable, elle est partiellement réunie par un point de suture. Dans un délai variant entre 5 et 10 jours, l'animal présente les premiers signes d'un tétanos qui progresse rapidement et le tue en 28 ou 36 heures. L'expérience a été faite sur cobayes et 2 lapins, soit avec des cultures chauffées à 65°, soit avec des dépôts de cultures soumis au lavage. Tous ces animaux ont pris le tétanos plus ou moins rapidement ; un seul a survécu après avoir présenté un tétanos chronique.

Le moyen est donc sûr pour infecter les animaux avec des doses très faibles de microbes sans toxine. L'explication en est simple ; elle découle naturellement de la particularité suivante, constamment relevée. Chez les animaux dont il s'agit, la plaie d'inoculation était toujours le siège d'une suppuration modérée

ou d'une irritation se traduisant par un suintement séro-purulent, quelquefois hématique. Dans le pus et les liquides issus de ces plaies existaient, en quantité variable, des organismes divers, microcoques, bacilles, surtout des microbes pyogènes. En raison des souillures faciles de la plaie, les spores du tétanos avaient cessé rapidement d'être à l'état de pureté. L'immixtion des microbes adventices réalisait dans ces expériences, sous des formes variées et complexes, l'association microbienne dont un type simple nous a été fourni par l'expérience faite avec le *micr. prodigiosus:* les conséquences de celle-ci éclairent suffisamment les conséquences de celles-là.

Nous ne voulons pas dire que toutes les associations de ce genre puissent être également efficaces pour favoriser l'infection, car il n'est pas indifférent que tel ou tel microbe intervienne en pareil cas. Ce que le *micr. prodigiosus* et les bacilles ou microcoques rencontrés dans les plaies des animaux précédents ont pu faire, ne sera peut-être pas réalisé par un autre organisme. Nos recherches dans ce sens n'ont pas été très étendues ; toutefois nous n'avons pas réussi à provoquer le tétanos chez les lapins en leur introduisant sous la peau des fragments de bois ou du sable imprégnés de spores tétaniques et de bacilles de Friedlander, de *staphylococcus pyogenes aureus,* de streptocoque, de *bacillus subtilis.* Il faut donc admettre que certains microbes, qu'il serait peut-être intéressant de déterminer, ont seuls la propriété de faciliter l'évolution de l'agent pathogène dans les tissus.

Toutes ces notions sont suggestives; elles permettent de mieux comprendre les faits qui se rapportent à l'étiologie du tétanos spontané. Il ne suffira pas de la pénétration de l'agent pathogène dans l'organisme pour que la maladie s'ensuive : ainsi s'explique la rareté relative du tétanos, malgré l'ubiquité du microbe qui le provoque et la facilité avec laquelle il peut être apporté au contact des plaies. Diverses conditions, dont quelques-unes connues, sont nécessaires pour que l'infection se produise : un trouble dans la vitalité des tissus où le bacille pénètre, l'état de la plaie qui le reçoit, surtout l'association avec certains microbes représentent autant de facteurs qui doivent jouer un rôle de premier ordre. Ainsi s'explique l'action tétanigène de la terre si riche en microbes divers qui aident au développement de

l'agent pathogène, et aussi à l'inoculabilité constante des produits recueillis dans la plaie des tétaniques, où le bacille spécifique est toujours mélangé à d'autres espèces.

III

Les phagocytes et le bacille du tétanos. — Pourquoi les bacilles tétaniques ou les spores sans toxine sont-ils incapables de se développer et de produire la maladie, lorsqu'ils sont introduits à l'état de pureté dans un tissu sain?

Il est facile de l'apprécier si l'on suit le sort de l'agent pathogène après qu'il a pénétré dans ce tissu.

Le procédé de l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil des animaux sensibles à la maladie, cobaye ou lapin, n'est pas le plus favorable à cette étude : du moins il ne nous a pas donné à cet égard les mêmes facilités que les autres méthodes de recherche; il fournit cependant des indications utiles. Après l'injection d'une petite quantité de spores privées de toxine par le lavage ou le chauffage à 65°, il ne tarde pas à se produire un trouble marqué de l'humeur aqueuse; un dépôt de leucocytes se forme à la partie déclive de la chambre antérieure. En prélevant du liquide dans la cavité oculaire à des périodes variables après l'infection, on constate, dans la généralité des cas, que les microbes ont déjà disparu après 5 ou 6 heures; les leucocytes sont abondants et quelques-uns renferment à leur intérieur une ou plusieurs spores colorables. Mais, en raison de la difficulté que l'on éprouve à vider la chambre antérieure de son contenu, il est malaisé de suivre avec rigueur toutes les phases du phénomène. Deux faits, toutefois, paraissent certains : d'une part, l'élimination des microbes dès les premières heures de leur pénétration; d'autre part, la présence de spores dans le protoplasma des leucocytes, d'où l'on peut inférer le mécanisme réel de la disparition de l'agent pathogène.

Plus rigoureuses et plus significatives deviennent les constatations si on a recours, chez le lapin, au procédé des lamelles de Ziegler chargées de microbes sans toxine et introduites sous la peau de la région de l'aine. On peut encore, et non moins utilement, opérer sur le cobaye en plaçant, avec la plus rigoureuse

asepsie, dans une poche du tissu conjonctif sous-cutané, un petit fragment d'ouate stérile, imprégné de bacilles sporulés sans toxine.

Les lamelles de Ziegler examinées après 5 ou 6 heures ne montrent déjà presque plus de microbes libres, mais on y trouve en notable quantité des leucocytes contenant de 1 à 4 spores colorables. Presque toujours ces spores sont vivement teintées par la fuchsine de Ziehl; quelquefois elles sont pâles, réduites de volume comme si elles étaient déjà en partie détruites. Si l'examen des lamelles est retardé jusqu'à la 18e ou la 24e heure, les leucocytes qui renferment des spores sont devenus très peu nombreux; peut-être ont-ils émigré ailleurs, peut-être ont-ils digéré les spores sur place.

L'étude des petits fragments d'ouate imprégnés de spores sans toxine et introduits sous la peau du cobaye conduit à des résultats identiques. Sur les préparations faites avec l'ouate qui a séjourné 1 heure 1/2 dans la logette sous-cutanée, les leucocytes ne sont pas encore abondants, mais plusieurs contiennent de 1 à 3 spores; beaucoup de microbes sont libres. Après 5, 4, et même 3 heures, on ne trouve plus de bacilles libres, les leucocytes sont devenus très nombreux et ils renferment des spores dont les unes sont fortement colorées, les autres pâles et de diamètre réduit.

Les phagocytes englobent donc les bacilles et les spores qui ont été introduits sous la peau ou dans la chambre antérieure de l'œil. La lutte est précoce entre les microbes et les éléments cellulaires; elle s'établit dès les premiers instants de l'infection, et l'on est tenté de croire que, très rapidement aussi, les leucocytes détruisent l'envahisseur, car il est impossible d'en retrouver trace après 18 ou 20 heures: la teinte pâle et la réduction de volume que présentent parfois les spores ingérées autorise au moins à le penser.

On ne saurait chercher ailleurs que dans le phénomène de la phagocytose l'interprétation exacte des faits où l'on a vu de grandes quantités de bacilles ou de spores dépourvus de toxine rester inertes et sans effet sur l'animal: les bacilles ne pullulent pas, les spores sont incapables de germer parce que les uns et les autres sont immédiatement englobés par les leucocytes. L'organisme, en effet, n'est pas un milieu de culture inerte; il se défend,

et, dans les conditions indiquées, la défense est tellement sûre et prompte que le microbe est mis hors d'état de nuire avec une surprenante rapidité.

Si le fait de la phagocytose représente bien, dans la réalité, le système défensif d'un organisme sain menacé par les spores du bacille tétanique, une conséquence en découlera : toutes les influences qui pourront agir défavorablement sur les phagocytes, soit en les empêchant d'affluer au point contaminé, soit en paralysant leur activité, soit encore de toute autre manière, devront favoriser le développement des spores et, par suite, l'apparition du tétanos. C'est, en effet, ce qui paraît se produire dans les expériences où nous avons vu les spores sans toxine donner le tétanos aux animaux, grâce à l'intervention d'un agent chimique ou d'un microbe déterminé.

Dans le cas de l'injection de l'acide lactique, on ne trouve au foyer de la lésion musculaire qu'un nombre infime, à peine appréciable de leucocytes ; en revanche les microbes y confluent, non pas sous la forme des bacilles en épingle qui ont été injectés, mais de bâtonnets réguliers, isolés, articulés ou filamenteux, représentant l'état du microbe lorsqu'il est jeune et en voie de développement. N'est-il pas présumable que l'acide lactique a exercé une action vivement répulsive sur les leucocytes, et que, grâce à l'absence de ces derniers, les spores ont pu germer à leur aise, comme dans un bouillon de culture?

Tout autres sont les conditions réalisées par l'injection simultanée du *microbacillus prodigiosus* et des spores du bacille tétanique. Au point inoculé s'étale un exsudat membraneux épais, environné par une large zone d'hypérémie avec léger œdème. La pseudo-membrane est uniquement formée de leucocytes pressés qui abondent également dans les régions œdématiées. Sur toutes les préparations, entre les leucocytes, on trouve en abondance les bâtonnets du bacille tétanique en voie de multiplication. Ici donc, malgré un afflux leucocytaire colossal, les spores n'ont pas été englobées, elles ont pu germer et produire la maladie. Le fait n'a rien de contradictoire avec la notion établie plus haut concernant le rôle défensif dévolu aux phagocytes. Des millions de *microbacillus prodigiosus* ont été injectés ; on n'en retrouve plus trace au point d'inoculation, sauf dans les leucocytes. N'y a-t-il pas lieu de croire que les phagocytes ont

d'abord et uniquement englobé les cellules de cet agent banal, laissant aux spores du tétanos le temps de germer et aux bacilles issus de ces dernières le loisir de sécréter la toxine. Le leucocyte n'est pas guidé par un mobile conscient, mais par une véritable attraction d'ordre purement chimique ou physique; il va à ce qui l'attire le plus, et, dans le cas particulier, ce n'était vraisemblablement pas l'agent pathogène.

Qu'il s'agisse de l'acide lactique ou du *microbacillus prodigiosus*, le mécanisme de l'infection est au fond le même : l'acide lactique écarte les leucocytes et permet aux spores d'évoluer; le *microbacillus prodigiosus* attire les leucocytes, mais absorbe toute leur activité, et, pendant ce temps, les spores dangereuses germent.

Tous les faits expérimentaux ne se prêtent pas à une interprétation aussi facile. Par quel mécanisme ont agi les associations microbiennes qui provoquaient le tétanos chez les animaux porteurs d'une plaie ouverte et préalablement infectée? Tantôt il y avait suppuration, mais réduite à des proportions insignifiantes; tantôt la plaie, presque oblitérée, laissait suinter un liquide hématique extrêmement pauvre en cellules blanches. Évidemment l'afflux leucocytaire capable de préserver l'animal avait été réduit ou empêché. Comment? On ne peut que constater le fait et en soupçonner la cause. Notons qu'il suffit de quelques spores qui germent pour sécréter la dose de toxine capable de donner la mort. C'est à peine si, dans les plaies ouvertes, on trouvait quelques bacilles tétaniques; dans l'exemple précédemment cité du cobaye qui avait succombé après une contusion de la cuisse, il a été impossible, par l'examen microscopique, de saisir le foyer de la culture des spores qui avaient provoqué le tétanos.

Après avoir mis en relief le rôle hautement préservateur des phagocytes, il convient d'ajouter qu'il a cependant des limites. Efficace lorsqu'il s'agit de spores dégagées de toute toxine, il deviendra presque nul si les microbes ont pu déjà sécréter leur poison. Ce dernier, en effet, jouit de propriétés chimiotactiques dont mention doit être faite.

Si l'on place sous la peau de l'oreille du lapin des tubes capillaires contenant une culture chauffée à 65°, on voit que très rapidement leur extrémité ouverte est encombrée de leuco-

cytes; ceux-ci, après 15 heures, ont formé un bouchon qui s'élève sur une hauteur de 1 millimètre à 1 millimètre 1/2. Des tubes semblables, mais remplis d'une culture non chauffée, sont introduits comparativement sous la peau de l'oreille du même animal; c'est à peine si, après 15 heures, la limpidité du liquide renfermé dans les tubes est troublée; les cellules blanches y sont presque rares, et l'on ne constate pas l'existence du bouchon leucocytaire comme dans le cas précédent.

La toxine n'attire donc pas les leucocytes, elle paraît même les repousser, tandis que les microbes, dégagés de leur poison, exercent sur eux une attraction très marquée.

Le rôle préservateur des phagocytes sera donc plus ou moins facile, suivant que les cellules auront à agir sur des microbes accompagnés de leur toxine, ou sur des spores dégagées de toute trace de poison. L'expérience suivante semble l'indiquer. Une culture ne contenant que des spores est divisée en deux parties; l'une est chauffée pendant 15 minutes à 65°, l'autre reste en l'état. Avec ces deux liquides, on emplit un certain nombre de tubes capillaires qui sont insérés simultanément sous la peau de l'oreille de plusieurs lapins. A des périodes variables on retire un tube de chaque espèce, et on recueille exclusivement le liquide qui se trouve à son extrémité ouverte, c'est-à-dire celui qui contient le plus de leucocytes. Ce liquide est ensuite ensemencé en bouillon dans le but de savoir ce qu'il est advenu de la vitalité des spores ainsi maintenues au contact des cellules blanches. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

Culture non chauffée.		Culture chauffée.	
Durée du séjour du tube sous la peau.	Résultat de l'ensemencement.	Durée du séjour du tube sous la peau.	Résultat de l'ensemencement
24 heures	+	5 heures	+
36 —	+	8 —	+
40 —	+	9 —	+
48 —	+	13 —	+
4 jours	+	15 —	—
7 —	+	17 —	—
		3 jours	—

Après 13 heures, on ne trouve plus de spores revivifiables dans les tubes contenant la culture chauffée (fait qui concorde avec les données précédentes), tandis que ces spores sont encore bien vivantes après 7 jours, lorsqu'elles sont exposées, munies

de leur toxine, à l'action des cellules blanches. Dans le premier cas, l'afflux leucocytaire a été abondant et la phagocytose rapide; dans le second, la toxine, en vertu de ses propriétés chimiotactiques, a réduit à des proportions très minimes la migration des leucocytes, paralysé peut-être leur action, et protègé ainsi les spores contre l'englobement. Si l'on applique ces résultats aux circonstances de l'infection naturelle, il en ressort que les phagocytes pourront agir utilement lorsque les spores n'auront pas encore germé et produit leur poison, mais que leur intervention sera difficile ou nulle dès que les microbes auront déjà commencé à élaborer la toxine.

RECHERCHES SUR LA FONCTION DE LA RATE

DANS LES MALADIES INFECTIEUSES

(2e MÉMOIRE.)

PAR M. J. BARDACH.

Dans un premier article [1] sur le rôle de la rate dans les maladies infectieuses, j'ai cherché à prouver (par des expériences sur des chiens) que la fonction de cet organe était surtout phagocytaire ; c'est la rate qui protège le sang contre l'invasion des microbes et qui produit les phagocytes de l'organisme. Son caractère phagocytaire est en parfait accord avec les données scientifiques sur son embryologie, son histologie, son anatomie pathologique, ainsi qu'avec l'expérience.

M. Kourloff, dans des expériences sur des lapins dératés, est arrivé à des conclusions différentes, mais qui ne peuvent être acceptées, car une partie de ses expériences a été faite dans des conditions où le rôle de la rate ne pouvait être mis en évidence : M. Kourloff injectait dans le sang des microbes, pathogènes aussi pour les lapins non dératés. Dans ces conditions, les lapins normaux succombaient tout aussi bien que les dératés; parfois avant, parfois après. Mais la durée de la survie ne peut servir de *criterium*, car, inoculés par un même microbe pathogène, les lapins normaux, et en général des animaux de même espèce pris dans des conditions de vie aussi semblables que possible, meurent à des termes différents. La durée de la survie dépend d'une foule de propriétés individuelles.

En ce qui concerne la seconde partie des expériences de M. Kourloff, celles qui ont été faites avec des microbes peu ou point pathogènes, il faut en exclure 5, dans lesquelles les té-

1. Ces *Annales*, t. III, p. 577.

moins succombèrent aussi bien que les lapins dératés. Quant aux 6 autres expériences, leurs résultats ne peuvent donner lieu à des conclusions quelconques, parce que les microbes étaient inoculés sous la peau, de sorte que la recherche de l'influence de la rate était compliquée par l'introduction des leucocytes et des phagocytes du tissu conjonctif, qui peuvent entrer en action, même chez des animaux aussi sensibles au charbon que les lapins : ainsi, dans les inoculations sous-cutanées, on trouve chez eux, quoique rarement, des bactéridies englobées dans les cellules; chez les animaux réfractaires, comme le chien, la phagocytose est plus prononcée, à peu près cinq à six fois plus que chez le lapin. Il est évident que pour juger du rôle de la rate, il est indispensable d'éviter tous les facteurs qui peuvent obscurcir ses fonctions, et c'est justement ce qui n'a pas été fait dans le travail de M. Kourloff.

Des travaux récents tendent à expliquer l'immunité naturelle et acquise, aussi bien que la guérison, par les propriétés bactéricides du plasma sanguin et de ses dérivés, lymphe, etc. Ces travaux semblent être en contradiction avec le rôle phagocytaire de la rate, comme organe représentant une agglomération d'éléments cellulaires. Ainsi M. Fodor croit que les microbes (bactéridies) parvenus dans le foie, la rate et les autres organes, y sont moins exposés à l'influence bactéricide que dans le sang de la circulation, si bien qu'ils peuvent y pulluler et pénétrer dans le sang. Là, ils sont détruits; mais le foie et la rate, qui sont pour eux des milieux très favorables, continuent à en fournir de nouvelles tribus, qui finissent par vaincre la résistance du sang, l'envahissent et amènent la mort de l'organisme. A ce point de vue, la rate serait plutôt un organe favorisant le développement de la maladie.

Mais une analyse plus approfondie des données acquises à ce sujet démontre l'inexactitude du point de vue de M. Fodor. Ainsi on a souvent vu la propriété bactéricide du sang de telle ou telle espèce animale être sans aucun rapport avec sa sensibilité pour telle ou telle maladie : la propriété bactéricide du sang du lapin est très forte en comparaison de celle du chien qui, lui, contrairement au lapin, possède une immunité naturelle pour le charbon, et même est très peu sensible aux inoculations.

Contrairement aux suppositions de M. Fodor, le pouvoir bactéricide du sang nouvellement épanché est beaucoup plus grand

que celui du sang de la circulation, comme l'a démontré M. Lubarsch sur des chats et des lapins. Ainsi, dans une des expériences, 1 centimètre cube du sang de lapin avait tué 2 millions et demi de bactéridies, tandis que tout le sang dans l'organisme du lapin ne pouvait détruire ni même arrêter le développement de 16,450 bactéridies.

Il est clair que le pouvoir bactéricide du sang, qui augmente tant et si rapidement en dehors de l'organisme, est dû à quelque procès post-mortel s'opérant dans les éléments sanguins, mis dans des conditions différentes de leur vie normale. M. Lubarsch essaie d'expliquer la différence de l'action intra et extra-vasculaire du sang par l'hypothèse suivante : il admet que le sang de la circulation contient un facteur, favorable au développement des bactéridies, et il trouve ce facteur dans le procès constant de destruction des globules sanguins dans la rate, le foie, et la moelle des os, procès d'où résulte un milieu nutritif pour les bactéridies, qui surmontent ainsi le pouvoir bactéricide du sang.

L'inexactitude de cette opinion est évidente, car les observations directes sur le sort des microbes introduits dans le sang, et englobés par les micro et macrophages de la rate, lui sont complètement contradictoires.

Comment aussi concilier avec ce point de vue l'absence si remarquable de spirilles dans la rate pendant la fièvre récurrente, tandis qu'elles pullulent dans le sang pendant la maladie, et, par contre, leur présence dans la rate et leur disparition dans le sang justement pendant la guérison, l'apyrexie ? Comment concilier aussi les expériences faites par moi, et où, après l'inoculation du charbon, il succomba 15 chiens sur 25 dé ratés et seulement 5 sur 25 non dérates ?

Il est évident que la cause de l'immunité naturelle et acquise, et de la guérison, est due à l'influence active des éléments cellulaires et des organes spéciaux ; car j'ai démontré dans mon premier travail qu'on a toujours un développement abondant en ensemençant les bactéridies sur la rate fraîche d'un chien normal, et d'un chien ayant résisté à une inoculation charbonneuse.

Il est vrai que M. Buchner a objecté qu'en flambant la surface de la rate, j'élevais la température de ses tissus, et que j'éliminais par là le facteur bactéricide, qui disparaît après un chauffage à 55° pendant un quart d'heure. Mais il est évident

que le flambage superficiel, rapide, d'un corps si mauvais conducteur que l'est la pulpe de la rate, ne peut élever la température du tissu intérieur à 55°. La preuve en est que les tissus sous-jacents à l'escarre restent complètement normaux. Du reste, l'expérience a prononcé. En introduisant un thermomètre très sensible dans la pulpe de la rate nouvellement extraite et en flambant la surface immédiatement au-dessus de la boule, on parvient à élever la température tout au plus de 2 degrés.

Température avant le flambage	36°,7	36°,2	33°,0
— après	36°,8	37°,1	34°,7

Ainsi il est clair que c'est à la cellule *vivante* qu'est due l'immunité naturelle et acquise. Il était très important d'observer à ce point de vue un microbe, qui, inoculé dans le sang d'un animal normal, est non seulement inoffensif pour lui, mais encore indispensable comme facteur de son immunisation ; je veux parler du premier vaccin charbonneux.

On sait que MM. Roux et Chamberland ont vacciné des lapins en leur inoculant de grandes quantités du premier vaccin directement dans le sang, et puis 0cc,25 du deuxième vaccin sous la peau. Dans l'injection intra-veineuse du premier vaccin charbonneux, les bactéridies disparaissent très vite du sang, et déjà, après quelques heures, on les retrouve dans les organes, dans les cellules de la pulpe de la rate. Comme le vaccin disparaît du sang dans un temps très court, et ne se retrouve que dans les organes, et comme l'inoculation du premier vaccin a pour résultat l'immunité contre le second, on peut admettre que cette vaccination s'opère dans les organes dont les éléments cellulaires s'accoutument à digérer les bactéridies du premier vaccin et fournissent aux tissus de l'organisme des cellules déjà adaptées.

Pour distinguer le rôle de la rate de celui des autres organes dans le procès de la vaccination, j'ai fait une série d'expériences parallèles sur des lapins normaux et dératés.

En général, les lapins supportent facilement l'opération : ils se rétablissent bientôt, regagnent leur poids primitif, mangent et boivent normalement. Pour mes expériences, je me servais habituellement de lapins qui avaient subi l'opération depuis un à trois mois. Je prenais pour témoins des lapins de même poids. J'injectais 40 centimètres cubes du premier vaccin dans la veine de l'oreille, opération que les lapins supportent très bien. J'ai

fait en tout 35 expériences, tous les lapins *normaux* supportèrent très bien la vaccination ; leur température subissait des oscillations dans les limites normales ; les accès de fièvre vaccinale n'étaient que de courte durée pendant le 2e, 3e jour. Quant aux lapins *dératés*, il en succomba 26 sur 35.

On ne peut attribuer ce résultat frappant qu'à l'absence de la rate. L'influence de cette absence se faisait sentir déjà le 2e, 3e jour après l'inoculation : tandis que les lapins normaux mangeaient et buvaient bien, les lapins dératés étaient sans appétit, inertes ; leur température s'élevait jusqu'à 40 — 41° ; elle restait élevée pendant 2, 3 jours, après quoi les lapins succombaient. Quelquefois le lapin dératé paraissait rester en bonne santé pendant 6 à 7 jours après l'inoculation du premier vaccin, et ensuite il succombait tout à coup. A l'autopsie, on trouvait toujours dans le sang et les organes des bactéridies caractéristiques du charbon. Des ensemencements étaient toujours faits avec le sang et les organes, et donnaient des résultats positifs. Les cultures se développaient faiblement sur la gélatine et abondamment dans le bouillon et sur la gélose.

Comme les résultats de ces nombreuses expériences ont été constants, nous avons le droit de conclure que la mortalité par le premier vaccin est due à l'absence de la rate, c'est-à-dire que parmi les organes contribuant à l'efficacité de la vaccination, c'est la rate qui joue le rôle principal. La preuve qu'elle n'est pas le *seul* organe contribuant à l'acquisition de l'immunité est fournie par ce fait qu'il y a des cas (9 sur 35) de résistance au premier vaccin parmi les lapins dératés.

Ces expériences sur les lapins servent d'appuis à celles que j'ai faites sur les chiens.

Voici en résumé les 7 expériences que j'ai faites :

	Lapins normaux.		Lapins dératés.	
	Inoculés.	Morts.	Inoculés.	Morts.
2 octobre	5	0	5	5
10 —	5	0	5	5
15 —	5	0	5	3
29 —	5	0	5	4
15 novembre	5	0	5	4
1er décembre	5	0	5	3
16 —	5	0	5	2
Total	35 tém.	Mortal. nulle.	35 lap. dér.	26 morts.

EXPÉRIENCE DU 15 OCTOBRE

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	15		16		17		18		19		20	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 980gr	38.6	39.1	39.9	39.5	40.1	40.2	40.8	40.8	40.0	39.3	+	
II — 950	38.8	39.9	40.0	40.9	39.6	39.5	39.1	39.9	39.5	39.6	39.2	39.4
III — 945	38.4	39.2	39.9	41.0	40.4	40.5	40.8	40.8	+			
IV — 915	39.2	39.7	39.7	40.4	40.1	40.9	39.6	37.4	36.5	+		
V — 905	39.0	39.2	39.8	39.9	40.0	39.1	39.0	39.6	39.5	39.7	39.8	35.5
TÉMOINS												
I — 945	38.7	39.1	39.5	40.0	39.2	39.4	39.5	39.6	39.1	39.2	39.1	39.4
II — 916	39.1	39.4	39.6	39.9	40.0	39.1	39.4	39.2	39.3	39.4	39.1	39.4
III — 970	38.9	38.9	39.2	39.9	39.1	39.5	39.0	39.4	39.1	39.1	38.7	39.1
IV — 928	38.8	39.2	39.9	39.1	39.1	39.2	39.4	39.5	39.1	39.4	39.0	39.2
V — 915	39.0	39.1	40.2	39.1	39.1	39.9	39.2	39.5	39.1	39.4	39.1	39.5

I. Mort dans la nuit du 20: foie et mésentère hypérémiés; pas d'œdème; bactéridies dans le sang et les organes, les ensemencements donnèrent des résultats positifs.

III. Mort dans la nuit du 19; forte hypérémie des poumons et du foie, bactéridies dans le sang et les organes; ensemencements positifs.

IV. Mort le 19. Hypérémie prononcée du foie; bactéridies dans le sang et les organes. Les ensemencements donnèrent des résultats positifs.

Les lapins II et V survécurent. La température du II s'élèva de plus de 2 degrés. Le 16, il était très faible, mais bientôt il se rétablit complètement.

Le Ve réagit par une fièvre légère, qui peut être observée chez les lapins normaux. La température s'était élevée de 39°,2 à 39°, 39°,5, 40°,0 et était restée normale ensuite.

EXPÉRIENCE DU 29 OCTOBRE.

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	29		30		31		1		2		3	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 950gr	38.7	39.6	39.9	40.1	39.8	40.2	40.5	40.8	39.7	38.5	37.6	+
II — 965	38.8	38.9	40.2	41.1	39.6	39.4	39.2	39.5	39.1	39.9	39.2	39.5
III — 967	38.9	39.2	39.1	39.9	41.2	41.4	41.6	+				
IV — 915	39.1	39.7	39.9	40.1	40.2	40.8	40.1	40.4	40.2	39.2	36.8	+
V — 980	39.2	39.5	40.1	40.9	40.4	41.0	39.6	38.7	+			
TÉMOINS												
I — 1015	39.2	39.4	39.3	41.2	38.7	39.2	39.1	39.4	39.2	39.5	39.1	39.5
II — 970	39.1	39.5	39.8	40.6	39.2	39.4	39.1	39.7	39.7	39.5	39.6	39.7
III — 940	39.1	39.4	39.0	39.5	39.1	39.3	39.2	39.3	39.5	38.5	39.0	39.1
IV — 1010	38.9	39.2	39.2	39.9	39.1	38.7	38.8	38.9	38.5	39.2	38.6	38.5
V — 918	38.8	38.9	39.7	40.1	39.6	39.9	39.1	39.5	39.1	39.6	39.1	39.8

I. Mort le 3. Quelques nodosités contenant des psorospermies dans le foie, qui est agrandi. Lobe inférieur du poumon droit hépatisé; reins et poumons hypérémiés; le sang et les organes contiennent des bactéridies. Les ensemencements donnèrent des résultats positifs.

III. Mort le 1er. *Une forte hypérémie* de tous les organes parenchymateux; péricardite séreuse. Des bactéridies dans les organes et le sang. Les ensemencements donnèrent des résultats positifs.

IV. Mort le 3. Le foie et les reins hypérémiés; bactéridies dans le sang et les organes. Les ensemencements donnèrent des résultats positifs.

V. Mort la nuit du 2. Psorospermies dans le foie; une pleuro-pneumonie droite. Bactéridies dans le sang et les organes. Les ensemencements donnèrent des cultures.

II. Réagit par une courte élévation de température de 38°,8 à 40°,2, 41°,1 et s'est promptement rétabli ensuite.

EXPERIENCE DU 15 NOVEMBRE.

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	15		16		17		18		19		20	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 1055gr	39.2	39.5	39.8	39.8	40.5	41.1	40.8	41.0	40.7	37.6	+	
II — 1018	38.5	38.9	38.3	41.2	40.0	40.7	40.2	40.5	39.2	39.9	40.2	38.7
III — 990	38.9	39.2	39.9	40.5	40.4	39.6	39.2	39.4	39.2	39.5	39.7	39.8
IV — 940	39.0	39.2	39.9	40.4	41.2	41.4	40.6	40.8	+			
V — 950	38.5	38.9	40.1	40.6	40.1	40.4	40.0	+				
TÉMOINS												
I — 950	39.1	39.4	39.9	40.0	38.5	39.2	39.1	39.4	39.2	39.6	39.0	39.1
II — 960	39 0	39.2	39.9	40.2	39.6	39.2	39.2	39.5	39.1	39.4	39.0	39.5
III — 940	38.5	38.8	38.8	39.2	38.8	38.5	38.1	38.6	39.0	39.2	38.5	38.7
IV — 915	38.6	39.2	39.1	39.8	39.2	39.7	39.2	39.2	38.7	39.5	38.9	39.7
V — 925	38.9	39.3	40.8	40.0	38.2	38.8	38.5	39.0	39.2	39.7	39.1	39.4

I. Mort dans la nuit du 20. Phénomènes d'hypérémie générale. Bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs des cultures.

II. Mort dans la nuit du 21. Le foie contient beaucoup de psorospermies. Bactéridies dans les organes et le sang en petite quantité. Ensemencements positifs.

IV. Mort dans la nuit du 19. Beaucoup de bactéridies dans le sang et les organes. Ensemencements positifs.

V. Foie très agrandi; poumons fortement hypérémiés. Bactéridies dans le sang et les organes. Ensemencements positifs.

III. Fièvre pendant les deux premiers jours; absence d'appétit; rétablissement complet.

EXPÉRIENCE DU 1er DÉCEMBRE.

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	1		2		3		4		5		6	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 980gr	39.0	39.2	39.9	40.0	40.2	40.9	41.0	41.5	40.8	40.2	+	
II — 900	38.6	38.9	39.2	39.3	39.5	39.8	41.2	41.7	40.7	40.4	40.1	39.6
III — 910	39.1	39.3	39.5	39.8	39.3	41.2	39.2	39.5	39.0	39.5	39.1	39.4
IV — 915	38.8	39.2	38.9	40.1	40.4	40.7	41.2	+				
V — 910	39.2	39.7	30.9	40.5	40.2	40.8	40.9	41.1	40.4	40.8	40.0	40.2
TÉMOINS												
I — 905	38.8	39.2	40.9	39.5	39.1	39.8	39.2	39.5	39.6	39.8	39.2	39.5
II — 940	39.1	39.4	39.6	39.4	39.1	39.5	38.7	39.2	39.1	39.6	39.1	39.8
III - 925	39.0	39.5	41.0	39.7	39.0	39.6	39.5	39.6	39.0	39.2	38.9	39.7
IV — 965	38.7	39.2	40.1	39.2	39.1	39.4	39.4	39.7	38.7	39.6	38.6	39.5
V — 915	38.5	39.1	39.9	39.0	38.7	39.2	39.0	39.2	38.9	39.2	38.9	39.7

I. Mort dans la nuit du 6. Le foie agrandi est hypérémié ainsi que les poumons. Bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs.

IV. Mort le 4. Forte hypérémie de tous les organes internes. Bactéridies dans le sang et les organes. Ensemencements positifs.

V. Mort le 7. Poumons fortement hypérémiés; bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs.

Le II a eu, le 3e jour après l'inoculation, une forte fièvre qui dura pendant trois jours, après quoi il se rétablit complètement.

Le III ne réagit à l'inoculation des vaccins que par une courte mais forte élévation de température pendant le 2e jour. Il se rétablit complètement.

EXPÉRIENCE DU 2 OCTOBRE.

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	2		3		4		5		6		7	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 940gr	39.1	39.3	40.0	40.5	41.0	41.5	37.2	+				
II — 922	38.9	39.2	39.1	39.5	40.0	39.9	39.8	40.2	40.4	40.8	40.1	39.9
III — 1018	38.7	39.5	39.7	40.2	39.8	40.7	41.4	+				
IV — 925	39.4	39.2	39.0	39.9	41.2	41.8	41.4	41.7	36.9	36.2	+	
V — 943	39.0	39.1	39.5	39.9	40.8	37.6	38.9	38.7	+			
TÉMOINS												
I — 952	39.2	39.8	40.2	40.8	39.2	39.5	38.9	39.1	38.8	39.2	39.4	39.6
II — 1016	38.7	38.9	41.0	39.2	38.8	39.1	39.2	39.4	39.5	39.5	39.7	39.8
III — 948	39.1	39.4	39.2	39.5	39.1	39.1	39.2	39.4	38.8	39.1	39.1	39.2
IV — 915	38.9	39.5	40.3	40.9	38.5	38.9	39.1	39.5	39.1	39.4	39.2	39.4
V — 975	38.8	39.7	39.9	41.0	38.8	39.5	39.2	39.4	39.1	39.5	39.2	39.4

I. Mort le 5. Bactéridies sur les préparations du foie, de la rate, des poumons, des reins et du sang. Les ensemencements sur gélose et dans le bouillon donnèrent tous des cultures. Le foie hypérémié, ainsi que les poumons; pas d'œdèmes.

II. Mort le 8. Foie hypérémié, ainsi que les poumons, pas d'œdèmes. Des bactéridies sur les préparations colorées par le bleu de méthyle. Ensemencements positifs.

III. Mort le 5. Des foyers peu nombreux de psorospermies dans le foie, qui est agrandi et hypérémié; un exsudat séreux purulent dans la cavité pleurale. Une petite quantité de bactéridies dans l'exsudat. Des bactéridies sur les préparations faites avec les organes et le sang. Les ensemencements donnèrent des cultures.

IV. Mort le 7. Foie, reins et poumons hypérémiés; les glandes mésentériques agrandies. Bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs donnant des cultures.

V. Mort dans la nuit du 6. Le foie contient quelques foyers de psorospermies; les poumons fortement hypérémiés. Bactéridies sur les préparations des organes et du sang. Ensemencements positifs. Les témoins mangent et boivent; ils sont complètement normaux.

EXPÉRIENCE DU 10 OCTOBRE

LAPINS DÉRATÉS

POIDS	10		11		12		13		14		15	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 950gr	39.1	39.1	40.8	40.9	40.4	40.9	39.8	37.2	+			
II — 940	38.5	39.4	40.1	40.0	40.1	40.5	39.5	40.8	40.1	40.2	+	
III — 955	39.6	39.6	39.9	39.7	39.a	41.0	40.8	40.7	40.2	39.1	+	
IV — 986	39.1	39.4	39.9	40.1	39.5	39.1	39.3	39.8	37.1	+		
V — 945	38.5	39.3	39.9	40.1	40.5	40.6	41.0	37.6	36.9	36.5	36.5	+
TÉMOINS												
I — 910	39.2	39.4	40.6	39.6	39.9	39.9	39.5	39.8	39.6	39.1	39.2	39.7
II — 950	39.0	39.5	39.2	40.0	38.7	39.2	39.1	39.4	39.7	39.6	39.4	39.5
III — 915	38.5	39.9	40.3	39.2	38.6	39.5	37.5	39.1	38.5	39.2	39.1	39.4
IV — 945	39.1	39.1	40.0	39.9	38.5	39.6	38.5	39.1	39.2	39.5	39.4	39.1
V — 920	39.0	40.2	38.5	39.6	39.1	39.2	38.8	39.5	39.6	39.7	39.5	38.9

I. Mort dans la nuit du 14. Organes parenchymateux agrandis et hypérémiés; ils contiennent, ainsi que le sang, des bactéridies. Ensemencements positifs.

II. Mort dans la nuit du 15. Pas d'œdèmes; bactéridies dans les organes. Ensemencements positifs.

III. Mort dans la nuit du 15. Des psorospermies dans le foie; des bactéri-

dies dans les organes et le sang. Les ensemencements donnent des cultures.

IV. Mort le 14. Très épuisé; une diarrhée pendant le 11 et 14; les organes très anémiques; bactéridies dans le foie et le sang. Ensemencements positifs.

V. Foie, reins et glandes mésentériques très hypérémiés; bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs.

EXPÉRIENCE DU 16 DÉCEMBRE

POIDS	16		17		18		19		20		21	
	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s	m	s
I — 940gr	38.5	39.6	40.1	40.4	40.2	40.5	40.1	40.8	40.1	40.5	40.4	40.5
II — 1015	39.6	39.9	39.4	41.5	40.0	41.0	40.5	+				
III — 955	38.7	39.2	39.9	40.5	39.8	40.5	39.2	39.5	39.1	39.8	39.6	39.7
IV — 915	38.9	39.1	39.2	40.2	39.1	39.0	38.5	39.0	38.2	39.5	38.5	39.0
V — 920	39.0	39.4	40.5	40.0	39.1	39.3	39.0	39.6	38.7	39.2	38.8	39.5
TÉMOINS												
I — 950	38.8	39.5	40.3	39.7	38.7	39.2	38.5	39.6	38.5	39.3	39.1	39.2
II — 960	39.1	39.8	40.2	39.1	39.3	39.5	39.6	39.5	39.0	39.1	38.7	39.5
III — 915	39.0	39.5	39.1	39.5	39.1	39.5	39.4	39.7	39.1	39.5	39.6	39.7
IV — 920	38.7	39.1	40.3	40.1	38.8	38.5	38.6	39.2	38.7	39.5	39.0	39.2
V — 945	38.6	39.1	38.5	39.5	39.1	39.5	39.2	39.5	39.4	39.6	39.1	39.5

I. Mort le 6e jour avec des phénomènes d'hypérémie prononcée des poumons et du foie. Des bactéridies dans les organes et le sang. Ensemencements positifs.

II. Mort le 3e jour avec des phénomènes d'hypérémie générale des organes; pas d'œdèmes; des bactéridies dans le sang et les organes. Les ensemencements donnèrent des cultures.

III. Fièvre le second et le troisième jour après l'inoculation; puis rétablissement complet.

IV. L'élévation de température ne fut observée qu'une seule fois le second jour; une guérison complète suivit.

V. Fi èvre second jour après l'inoculation, suivie d'une guérison complète.

REVUES ET ANALYSES

SUR LA STÉRILISATION DU LAIT

REVUE CRITIQUE

Escherich. Sur la stérilisation du lait, avec présentation d'appareils fondés sur le principe de Soxhlet. *Munch. med. Wochenschr.*, 1889, 46-48. — Emma Strub. Sur la stérilisation du lait. *Centralbl. f. Bact.*, 1890, t. VII, nos 21, 22, 23. — A. Lazarus. Les moyens usuels de conservation du lait. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. VIII, p. 207, 1890. — H. Bitter. Recherches sur la pasteurisation du lait. *Id.*, p. 240. — Heidenhain. Sur la stérilisation du lait par l'eau oxygénée. *Centralbl. f. Bact.*, t. VIII, n° 16, 1890. — Hesse. Sur la stérilisation du lait pour les enfants. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. IX, p. 360, 1890. — Sonnenberger. Origine et extension des maladies par le lait contaminé. *Deustsche med. Wochenschr.*, nos 48 et 49, 1890.

L'une des découvertes les plus profitables de la bactériologie moderne a été celle du rôle du lait comme agent de transport de certaines maladies contagieuses. C'est aussi une de celles qui ont le plus de peine à se faire une place dans les esprits, et à entrer dans la conscience publique. On consent à laisser accuser l'eau, à laquelle l'homme reste toujours sourdement hostile, et qui a été honnie par tant de poètes biberonnants. Mais le nom de lait réveille dans l'esprit tant d'idées souriantes et de clichés louangeurs qu'on accepte avec peine l'idée que ce liquide devienne parfois dangereux.

Il l'est pourtant souvent, soit que, provenant d'une vache saine, il ait recueilli au passage et transporté avec lui dans l'estomac des nourrissons les causes des affections intestinales des nouveau-nés, soit qu'il provienne d'une vache malade et lui ait emprunté, par exemple, des germes de tuberculose. On m'a accusé d'avoir exagéré ce dernier danger, et on a dit que le nombre des vaches tuberculeuses est beaucoup moins grand que je ne l'ai prétendu. Plus je vais, au contraire, et plus je m'informe, plus je crois que je suis resté au-dessous de la réalité. Sur la totalité des animaux tués dans les abattoirs, il y a Berlin 4, 57 %,

à Munich 2,44 %, à Augsbourg 2,24 %, à Mulhouse 3,4 %, d'animaux tuberculeux, et si on songe que, de ces bêtes immolées, les vaches sont en général les plus vieilles et celles qui ont été le plus exposées à la tuberculose, on conclura qu'il faudrait sensiblement élever les chiffres ci-dessus pour avoir les proportions des vaches tuberculeuses. Dans les abattoirs de la haute Silésie, où on a fait le détail, on trouve, en effet, atteints de tuberculose, 0, 13 % des veaux, 1 % des taureaux, 1, 87 % du jeune bétail, 7, 31 % des bœufs, 9, 54 %. des vaches, et comme on ne conduit dans les abattoirs que les animaux qui n'ont aucun signe extérieur de tuberculose, il est facile de conclure que le chiffre de 10 %, auquel je m'étais arrêté après enquête, est plutôt au-dessous qu'au-dessus de la réalité. Il restera, il est vrai, la ressource de dire que ce chiffre s'applique aux pays étrangers, non à la France, mais il faudra d'abord démontrer que nous y regardons d'aussi près qu'eux, et ce ne sera pas facile.

J'ai la conviction qu'une enquête sur l'extension de la tuberculose, si elle était bien faite, donnerait des résultats navrants. Combien il y a de paysans et de fermiers qui ne s'inquiètent pas de la *maladie des glandes* chez leurs animaux, ignorant que c'est de la tuberculose! M. Sonnenberger affirme connaître, dans son pays, des régions dans lesquelles il y a 40 à 60 % de tuberculeux dans les étables.

Il y a une autre maladie de la vache dont le transport par le lait, sans être aussi funeste que celui de la tuberculose, ne laisse pas que d'être quelquefois dangereux, c'est la fièvre aphteuse ou cocotte. Il y a une mortalité d'environ 50 % chez les veaux nourris avec un pareil lait. Les hommes, et surtout les enfants qui le consomment sans l'avoir fait bouillir souffrent de fièvre, d'insomnie, de vomissements, de coliques, de rougeurs et d'aphtes sur la muqueuse de la bouche et du nez. Demme a cité un grand nombre de cas pareils, et dans un cas de stomatite aphteuse grave qui avait entraîné la mort d'un enfant, il a relevé à l'autopsie l'agrandissement de la rate, une dégénérescence du foie et des reins, l'inflammation des follicules de l'intestin. Nous pourrions multiplier ces exemples, mais ceux-là suffisent pour donner une idée des dangers auxquels expose l'usage du lait consommé à l'état cru, alors même que l'on est à la campagne, qu'on le voit traire sous ses yeux, et qu'on est, ou plutôt qu'on croit être sûr de la bonne santé de la vache qui le fournit.

Quand on est obligé de se contenter du lait vendu sur le marché, il y a un danger de plus à courir, c'est que le lait ait ramassé en route, au milieu de ses multiples transvasements dans des vases d'une propreté toujours douteuse, les germes sans doute banaux de ces maladies du canal digestif qui atteignent quelquefois les adultes, mais sont surtout fréquentes chez les enfants nourris au biberon. L'étiologie

de ces affections a quelque chose d'étrange et d'inexplicable. L'expérience a appris qu'elles accompagnaient l'emploi de lait conservé trop longtemps avant d'être consommé, et ayant commencé a sûrir. Elles n'apparaissent pas ou sont au moins très rares quand on se dserte lait bouilli, elles disparaissent même peu à peu, et quelquefois rapidement, sous l'influence de ce lait. Or, nous allons voir que le lait bouilli n'ost pas privé de germes. En serait-il privé qu'il en rencontrerait sûrement de nouveaux dans la bouche, l'estomac ou l'intestin de l'enfant. Dès lors comment se fait-il que ces germes, qu'il puise dès son entrée, et qui l'accompagnent tout le long du canal intestinal, n'aient aucune qualité nocive, tandis que ceux qu'il a pu rencontrer à l'extérieur sur les parois des vases de transport, soient quelquefois si dangereux? Voilà une question à laquelle nous ne pouvons encore donner de réponse, mais que nous retrouverons tout à l'heure.

Quoi qu'il en soit, à côté du péril des germes de maladie empruntés à la vache, il faut placer celui des germes d'origine banale empruntés au monde extérieur. Ce sont ces derniers qui ont le plus préoccupé les producteurs de lait et les commerçants, non pas, ai-je besoin de le dire, à cause du danger, longtemps ignoré, qu'ils faisaient courir au consommateur, mais parce qu'ils menaçaient la conservation du lait lui-même, et, pour assurer cette conservation, surtout au moment des chaleurs, on a imaginé diverses pratiques que M. Lazarus a eu l'idée d'étudier au point de vue bactériologique.

Voici, par exemple, l'addition de carbonate ou de bicarbonate de soude. Quelle influence a-t-elle sur la multiplication des microbes qu'on rencontre le plus ordinairement dans les laits, et, si elle retarde le moment si redouté de la coagulation, par quel mécanisme y parvient elle? M. Lazarus a même poussé son enquête plus loin, et s'est demandé quelle était l'action des divers antiseptiques sur l'évolution de microbes pathogènes éventuellement présents dans le lait? Il a choisi pour cette étude les bactéries du choléra asiatique, du typhus abdominal, le bacille de Finkler-Prior, le *bacillus neapolitanus* d'Emmerich, et enfin le bacille décrit par Ribbert dans la diphtérie intestinale des lapins. Enfin il a poussé la conscience jusqu'à étudier comparativement le sort de ces bactéries pathogènes dans du lait stérilisé et dans du lait non stérilisé. Dans cet ordre d'idées, il a trouvé qu'elles croissaient mieux dans le premier que dans le second, où elles étaient d'ordinaire tuées par la concurrence vitale des espèces banales. Mais on ne gagne rien à mélanger tant d'influences, et nous nous contenterons de signaler les résultats obtenus avec le lait stérilisé, artificiellement infecté avec des espèces pathogènes, et soumis ou non à l'action des carbonates de soude, du borax ou de divers moyens de stérilisation.

Les expériences se faisaient en mettant côte à côte, dans des étuves chauffées à 20-22°, et à 35°, plusieurs tubes à essais renfermant les uns le lait normal, c'est-à-dire le lait fraîchement trait et non stérilisé, ou bien le lait stérilisé et additionné de microbes pathogènes, et les autres le même lait additionné de doses diverses d'antiseptiques; à diverses époques, on comptait, par la méthode des plaques de gélatine ,le nombre de germes présents dans un centimètre cube de lait.

Pour le carbonate et le bicarbonate de soude, M. Lazarus n'a pas dépassé la dose de 3 grammes par litre : c'est celle qu'on ne peut dépasser sans changer la saveur du lait. Comme ces sels donnent au lait une teinte brune pendant le chauffage, on stérilisait le lait à l'avance dans la vapeur d'eau bouillante; on y ajoutait ensuite le sel en solution stérilisée, et on faisait un nouveau chauffage d'un quart d'heure. La coloration du lait était alors à peine sensible.

Le résultat le plus curieux de ces expériences a été que le carbonate de soude, pas plus que le bicarbonate, n'a sensiblement retardé le moment de la coagulation, tout en retardant le moment de l'acidification. Peut-être M. Lazarus s'en étonne-t-il trop; on sait, depuis les expériences de M. Pasteur sur la génération spontanée, que le lait peut se coaguler en restant neutre, et j'ai démontré que cela était dû à ce que certains microbes produisent une présure en tout identique à celle de la caillette du veau. Ces microbes coagulent ce lait par un mécanisme tout autre que les microbes producteurs d'acides. Ils se sont trouvés accidentellement avoir le pas dans les laits étudiés par M. Lazarus, mais il pourra y avoir et même il y a souvent des cas où les autres prédominent à leur tour, et où l'addition de sels de soude retarde à la fois l'acidification et la coagulation. En d'autres termes, M. Lazarus a rencontré des faits contingents auxquels il a donné imprudemment une portée générale.

Au sujet des microbes pathogènes, ses résultats sont mieux assis. Kitasato avait déjà vu que, dans les milieux les plus nutritifs, une dose de 2 °/₀ de carbonate de soude gênait le développement du bacille typhique, et une dose de 2, 2 °/₀ celui du bacille du choléra de Koch. Avec des doses de 2,1 °/₀ pour le bacille du typhus, de 2,32 à 2, 47 °/₀ pour le bacille du choléra, il y avait arrêt; et mort respectivement pour des doses de 2, 47 °/₀ et de 2, 72 °/₀. La précision de ces chiffres est un peu illusoire ; ils dépendent des conditions de milieu, de température, de vitalité de la semence, etc. Lazarus a opéré avec des doses plus faibles, et n'a pu constater aucune influence nuisible des carbonates de soude sur les microbes pathogènes qu'il a étudiés dans ce lait. Il a même constaté, au contraire, une influence favorable sur les spirilles du choléra, ce qui est sans doute dû à ce que ces microbes redoutent l'acide qu'ils produisent dans les milieux de culture

et aiment, à raison de ce fait, que ce milieu soit un peu alcalin.

Avec l'acide salicylique, on n'a pas dépassé le dose de 75 centigrammes par litre; au delà, la saveur du produit devient trop sensible. A cette dose, malgré l'augmentation d'acidité du lait, la coagulation est retardée de 2 ou 3 jours. C'est que l'acide salicylique est un antiseptique, retarde le développement des germes présents dans le lait, ou même les détruit après un contact assez long. Mais c'est surtout à 22° que cette action est manifeste. A 35°, il n'en reste parfois plus trace.

Sur les microbes pathogènes, l'action de cet acide n'est pas moins énergique. Le bacille du choléra asiatique ne se développe pas en sa présence; bien plus, il périt en 6 à 9 heures à 22°, et en 12 à 24 heures à 35°. Il faut pourtant que l'ensemencement ait été médiocre, car lorsqu'il est plus copieux, il y a développement. Le bacille de Finkler-Prior est aussi très sensible; le bacille de Ribbert et celui d'Emmerich ont besoin d'une plus longue durée de contact pour périr.

Le bacille du typhus abdominal est en revanche très résistant, et se développe à peu près aussi vite dans le lait salicylé que dans le lait normal. En somme pourtant, l'acide salicylique est un agent puissant de conservation. Heureusement il coûte cher, et comme il peut être dangereux, c'est à juste raison qu'il est proscrit de toutes les matières destinées à l'alimentation.

L'acide borique est considéré comme moins dangereux. J'ai le regret de ne pouvoir me rendre à aucun des arguments mis en avant pour appuyer cette thèse, et qui sont les mêmes d'ailleurs pour toutes les thèses analogues. De ce qu'un animal à qui on fait avaler la substance à essayer ne commence à en souffrir que lorsque les doses deviennent trop fortes ou trop continues, on conclut que la substance est inoffensive pour l'homme. Je voudrais bien connaître quelqu'un assez pénétré de la force de ce raisonnement pour boire de la ciguë, sous prétexte que la chèvre la broute.

Quoi qu'il en soit, l'acide borique ni le borax ne se sont montrés des antiseptiques très actifs dans les mains de M. Lazarus. Il est vrai qu'il n'a pas dépassé des doses de 1 à 2 grammes par litre pour l'acide borique, et de 3 à 4 grammes pour le borax. Liborius avait trouvé que le bacille typhique dans le bouillon pousse encore avec 1,5 % d'acide borique, est gêné avec 2 % et n'est tué qu'à 2,7 %. Pour le vibrion du choléra, les chiffres correspondants sont 0,43 % 0,8 % 1,33 %; ce sont de 10 à 20 fois les doses maximum de Lazarus qui a tort, je crois, de dédaigner les effets médiocres qu'il a obtenus. D'abord ces effets sont sensibles dans toutes ses expériences, surtout pour le borax. Il a même une expérience dans laquelle les germes du choléra, semés en petit nombre dans des laits additionnés de 1 gramme par litre

d'acide borique ou de 2 grammes de borax, y avaient disparu au bout de 24 heures passées à 22°. Il est vrai qu'à 35° dans les mêmes tubes, la multiplication s'était faite à peu près comme dans le lait normal, et que, même à 22°, la présence de l'acide borique ou du borax ne gênent que faiblement les mêmes bacilles du choléra lorsqu'ils sont introduits en quantité plus grande. Mais j'ai montré depuis longtemps que toutes ces irrégularités sont en quelque sorte des irrégularités normales, qu'avec une dose déterminée d'antiseptique l'effet dépend du nombre de microbes présents, de la température, etc., de sorte qu'on n'a pas le droit de faire fi d'un antiseptique parce qu'il n'accomplit pas tous les miracles qu'on lui demande.

On pourrait trouver de nouveaux arguments en faveur de cette thèse dans les essais de Lazarus sur l'eau de chaux, qu'il a jugée inactive, tandis que Liborius lui avait attribué des propriétés antiseptiques très énergiques. Mais là encore les faits ne sont pas contradictoires en eux-mêmes ; ils ne le deviennent que lorsqu'on veut les ranger sous une formule commune.

En résumé, tous ces moyens chimiques de conservation du lait se sont montrés singulièrement peu puissants au point de vue bactériologique dans les essais de M. Lazarus, et nous nous trouvons très naturellement conduits à l'étude des moyens physiques de conservation, parmi lesquels les seuls utilisés jusqu'à ce moment sont le froid et la chaleur.

Le refroidissement et la congélation du lait ne le débarrassent pas, comme on sait, de ses microbes. Ils ne sont pour lui qu'une protection temporaire, qui a besoin d'être permanente pour être efficace, et qu'on ne rend permanente qu'à grands frais. La chaleur a, au contraire, un effet instantané, qu'on peut rendre plus ou moins complet en élevant plus ou moins haut la température. Aussi a-t-elle été très étudiée. Je n'ai pas l'intention d'entrer dans l'examen individuel des mémoires écrits sur ce sujet : j'en résumerai seulement les principales conclusions en faisant un court historique du développement des idées et des découvertes.

Lorsque l'hygiène et à sa suite l'industrie ont été amenées à s'occuper de ce sujet, la science possédait un certain nombre de faits assez solidement établis pour servir de jalons. On sait par exemple depuis longtemps qu'une simple ébullition à 100°, même faite dans des vases qui restent bouchés, et dans lesquels aucune contamination nouvelle n'est à craindre, ne suffit pas, le plus souvent, à préserver un lait de la coagulation. On sait aussi, depuis Gay-Lussac, qu'on arrive plus sûrement à ce résultat par plusieurs chauffages successifs à 100°, faits à 24 heures de distance l'un de l'autre. Enfin M. Pasteur nous a

appris qu'un seul chauffage de quelques minutes à 107° ou 108° suffisait à stériliser sûrement un lait quelconque.

Au point de vue industriel, un chauffage au-dessus de 100° a l'inconvénient d'exiger un autoclave, ou l'emploi incommode de solutions salines. En plus, l'expérience a bientôt appris que ce lait chauffé à 107° prenait, si rapidement que le chauffage soit fait, une saveur spéciale, un goût de cuit qui déplaisait au consommateur. Plus on abaisse la température, moins ce goût de cuit est apparent. J'avais vu qu'il était à peine sensible quand on ne dépasse pas 70°, et sous ce point de vue, les constatations de M. Bitter sont tout à fait d'accord avec les miennes. Comme d'un autre côté, la *pasteurisation* des vins se fait précisément au voisinage de 70°, on s'est demandé s'il ne suffirait pas de pasteuriser les laits à la même température pour en assurer la conservation.

De nombreuses tentatives ont été faites dans ce sens, et ont fait voir que le lait ainsi traité avait d'ordinaire une durée de conservation un peu supérieure à celle du lait naturel, mais quelquefois de très peu, de sorte que l'avantage du chauffage était problématique. Il ne saurait en être autrement. Le lait, recueilli dans les conditions ordinaires, est bientôt habité par des microbes très nombreux et très variés, dont quelques-uns ne résistent pas à l'action d'une température de 70°, mais dont la plupart s'en moquent. Il est même arrivé souvent, à l'origine, que le lait chauffé se gâtait plus vite que le lait non chauffé ; c'était lorsqu'on le laissait refroidir lentement, sous prétexte de le laisser plus longtemps sous l'action de la chaleur. On tuait bien ainsi, sans doute, quelques-uns des germes qu'un court séjour à 70° avait respectés ; mais ce lait qui refroidissait lentement, d'autant plus lentement que sa masse était plus grande, fournissait par contre de très bonnes conditions de température aux germes plus résistants, qui pouvaient éventuellement s'y multiplier plus vite que dans le même lait conservé à la température ordinaire.

Pour obvier à cet inconvénient, on a été conduit à refroidir rapidement ce lait chauffé. Sa durée de conservation dépasse alors sûrement celle du lait naturel, mais de 2 ou 3 jours au plus. Pour augmenter cette survie, on s'est ingénié, on a multiplié et alterné les chauffages et les refroidissements, on a changé et rechangé la forme des appareils. Il y en a, en ce moment, presque autant que de modèles de barattes, ce qui n'est pas peu dire, et ce sont les mêmes causes qui interviennent dans les deux cas. Un opérateur, n'ayant pas réussi avec un appareil, cherche dans la construction de cet appareil les raisons de son échec, qui n'y sont pas, puisqu'elles sont le plus souvent dans le lait et dans sa population variable. De là l'idée d'un changement de détails ou d'ensemble, changement qu'on réalise, qui réussit parce qu'il

finit naturellement par se plier à la nature du lait mis en œuvre, mais qui, insuffisant pour assurer la conservation d'un autre lait, conduit à l'idée de modifications nouvelles.

J'ai donné, l'an dernier, (*V.* t. III, p. 30, et t. IV, p. 185) quelques renseignements sur quelques-uns de ces appareils, je n'y reviendrai pas. Je voudrais seulement signaler ce que la science a appris de nouveau depuis un an sur ces laits pasteurisés.

Le fait le plus curieux est celui que j'ai visé plus haut : l'absence de coliques, de diarrhée verte, ou de désordres intestinaux chez les enfants nourris avec ce lait pasteurisé. J'ai ajourné tout à l'heure l'explication de ce fait. Je crois qu'on peut le mettre en regard de cet autre fait, révélé par la bactérologie et expressément noté par divers observateurs, que, dans ces laits pasteurisés, il n'y a plus guère que des bacilles, et que les micrococcus et les ferments lactiques sont presque toujours absents. Or, beaucoup de micrococcus, sans être de vrais ferments lactiques, acidifient le lait en agissant sur son sucre; au contraire les bacilles du lait sont presque exclusivement des ferments de la caséine, et rendent le lait alcalin. La pasteurisation à 70 ou 75° a donc pour effet de donner le pas aux ferments de la caséine sur les ferments du sucre, à ceux qui coagulent le lait à la façon de la présure sur ceux qui le coagulent à la façon des acides, et si on songe à la sensibilité de l'intestin du nourrisson vis-à-vis des liquides acides, à l'utilité de l'eau de chaux pour couper le lait dans certaines coliques, on conclura, je pense, qu'il y a toujours à redouter la présence des ferments acidifiants dans le lait des biberons, et que le chauffage à 70° peut rendre des services, alors même qu'il ne tue pas tous les microbes présents dans le lait. Il fait seulement une sélection grossière de ceux qui sont nuisibles et de ceux qui peuvent être utiles.

Voilà pour les bactéries en général. Si nous nous tournons maintenant du côté de celles qui sont pathogènes, nous allons encore trouver quelques faits intéressants. A quelle température faut-il chauffer le lait pour que certains microbes pathogènes y périssent. Rien ne nous dit *a priori* que ces températures soient les mêmes que dans d'autres liquides, ce qui nous dispense d'entrer dans l'examen des résultats, parfois contradictoires en apparence, obtenus dans cette voie. Préoccupons-nous seulement du lait.

Van Geuns avait trouvé, pour les températures minima qu'il suffit de laisser agir quelques secondes pour tuer les microbes pathogènes, les chiffres suivants :

Spirille du choléra.	58°
Sp. de Finkler-Prior.	58 à 59°
Bacille typhique.	60°
Pneumocoque de Friedlaender.	55 à 60°
Virus vaccinal.	60°

Lazarus a étudié la même question en se servant de l'appareil de pasteurisation de Thiel, duquel le lait sort dès qu'il a atteint une température maximum, de sorte que le séjour à cette température maximum est encore de durée très courte. Ici ce n'est guère qu'à 70° que le bacille typhique est à peu près sûrement tué; encore a-t-il résisté dans deux expériences à 75° et à 77°. Le *bacillus neapolitanus* se comporte comme le bacille typhique, et n'est pas sûrement tué à 75° dans l'appareil de Thiel. Le bacille du choléra disparaît entre 62° et 70°. Le *staphylococcus pyogenes aureus* est tué à 70°. Tous ces chiffres sont un peu supérieurs à ceux de Van Geuns, peut-être parce que le séjour à la température maximum était moins prolongé. C'est ce que pense M. Bitter, qui a fait construire un appareil dans lequel le lait est chauffé par un courant de vapeur circulant dans un serpentin, et peut être maintenu facilement pendant quelque temps à une température voulue en fermant convenablement la valve d'admission. Il s'est convaincu, par ce procédé, qu'aucun des germes de maladie que le lait peut transporter, en particulier les germes de la tuberculose, ne résistaient à un chauffage de 30 minutes à 68°, et comme à cette température il n'y a aucun changement appréciable apporté à la couleur du lait, ni à sa saveur, il recommande ce mode de chauffage et l'emploi de son appareil pour tous les laits destinés à être consommés sans subir un nouveau chauffage.

Ce lait, devenu inoffensif au point de vue hygiénique, peut en outre être conservé plus longtemps que le lait normal, surtout si on l'enferme dans des vases, stérilisés eux-mêmes en y faisant passer, pendant 15 minutes, un courant de vapeur à 100°. Mais aucune de ces pratiques ne tue tous les germes, nous le savons, de sorte que cette solution, très satisfaisante au point de vue hygiénique pour les laits qui doivent être rapidement consommés, ne peut s'appliquer au lait qu'on veut conserver longtemps ou faire voyager.

Un chauffage à 100°, de quelque façon qu'il soit fait, est même impuissant, nous le savons, à moins qu'il ne soit très prolongé. Mme E. Strub, qui a pris la peine d'étudier, à ce point de vue, les divers appareils de stérilisation qu'elle a pu réunir (Soltmann, Bertling, Gerber, Egli, Escherich, etc). dans lesquels le mode et la durée du chauffage à 100° sont très variés, à constaté qu'aucun d'eux ne débarrassait le lait de tous ses germes. Elle a même remarqué qu'il en restait obstinément un, liquéfiant la gélatine, qu'elle a pu identifier avec le *bacillus mesentericus vulgatus* de Flugge, et peut-être avec un bacille très résistant décrit par Globig dans un travail que nous avons analysé (ces *Annales*, t. II, p. 288). Les spores de ce bacille résistent à 1 heure et quart d'ébullition, et à tous les essais de stérilisation fractionnée qu'on peut faire sans altérer d'une façon irrémédiable la saveur et la couleur du

lait. Le bacille que j'ai décrit sous le nom de *Tyrothrix tenuis* est de la même famille, et donne, comme je m'en suis assuré, des résultats analogues. Il y en a probablement d'autres, mais ceux-ci, qui sont très répandus, suffisent pour que tous les procédés de stérilisation du lait qui s'arrêtent à la température de 100° soient sujets à caution. Ces procédés peuvent, pendant des périodes plus ou moins longues, donner de bons résultats, jusqu'au moment où brusquement, par suite de l'intervention de microbes plus résistants, tout change, et où ce qui avait réussi ne réussit plus. On élève alors la température, et c'est ce que font peu à peu les fabriques de lait stérilisé. Seulement elles se heurtent alors à ce goût de lait cuit, sur lequel on ne sait malheureusement rien, de sorte que, pour l'éviter, on en est réduit à l'empirisme.

Il me semble qu'au lieu de marcher toujours plus avant dans cette voie, il serait utile de revenir en arrière, et de se demander s'il ne vaudrait pas mieux éviter toute nécessité de chauffage, en évitant absolument l'introduction des germes nuisibles dans le lait. Dans une conférence faite le 7 juin 1889 au Trocadéro pendant l'Exposition universelle, je disais que « du lait proprement recueilli dans une étable bien tenue, et dans un vase bien nettoyé, par un vacher qui aurait bien lavé ses mains et les trayons de la vache, ne se coagulerait pas plus vite que du lait recueilli sans soins, et additionné de carbonate de soude pour masquer son défaut de propreté ». Cette idée, qui m'avait été suggérée par l'extraordinaire résistance que j'avais constatée, à mon laboratoire de Fau, pour du lait recueilli sous mes yeux dans des conditions très grandes de propreté, a été relevée par un de mes auditeurs, le Dr Smester [1], qui l'a appliquée en Normandie et livre en ce moment à la consommation, dans Paris, du lait non chauffé, privé de tout antiseptique, et dont la durée de conservation est très grande, même pendant les chaleurs. Il me semble que c'est de ce côté qu'est le progrès, au moins pour les laits destinés à être rapidement consommés, et non du côté de la multiplication ou du perfectionnement des appareils de pasteurisation. Il est vrai qu'une amélioration dans ce sens impliquerait l'introduction d'une propreté absolue dans les fermes et chez les fermiers, et on crée plus vite un outillage industriel qu'on ne réforme des habitudes traditionnelles. Mais les producteurs *pourraient* vite, si les consommateurs *voulaient* bien. Quand ceux-ci voudront du lait propre, ils l'auront. Ils auront toujours à le faire bouillir avant l'emploi, lorsqu'ils ne seront pas sûrs de l'état de la bête qui l'a fourni; mais la question n'en aura pas moins fait un grand pas quand laitiers et laitières sauront tous ce que c'est que la propreté.

Dx.

1. M. Smester poursuit ses essais en vue de l'application en grand.

P. Behr. Sur une race de bacilles du lait bleu ne donnant plus de matière colorante. *Centralbl. f. Bact.* t., VIII. n° 16, p. 485.

On sait depuis longtemps que le *bacillus prodigiosus* et le *bac. pyocyaneus* perdent, dans certaines conditions de culture, leur coloration caractéristique, mais la récupèrent lorsqu'on les transporte et qu'on les cultive pendant quelques générations sur un milieu convenable. On n'a encore que de rares exemples de microbes colorés donnant naissance à une variété incolore permanente. Heim a parlé (*Arb. a. d. k. Gesundh.* t. V, p. 526) d'une variété de bacille du lait bleu ne donnant plus de matière colorante. Au laboratoire de M. Lehmann, à Wurzbourg, on cultive 4 races de ce même bacille dont l'une, provenant de l'Institut hygiénique de Berlin, reste depuis février 1889 tout à fait incolore dans des cultures sur gélose et gélatine. Craignant qu'il n'y ait eu une substitution quelconque, M. Behr a entrepris de comparer cette variété incolore aux trois autres, et a constaté que, sauf la formation de matière colorante absente chez l'une, elles se ressemblaient sous tous les points de vue. Dans toutes, par exemple, on a observé les cils à l'aide de la méthode de coloration de Lœffler par la teinture de fuchsine.

Sur la pomme de terre pourtant, la variété incolore donne une teinte jaune brun, et on pouvait penser qu'une série de cultures sur ce milieu rendrait au bacille sa puissance colorante sur la gélatine et la gélose ; mais il n'en a rien été, et même du lait, ensemencé avec des bacilles de 4e génération sur la pomme de terre, est resté incolore.

M. Behr rapproche avec raison cette perte du pouvoir colorant des pertes de virulence ou de pouvoir diastasigène qui ont été relevées déjà chez de nombreux bacilles. Mais ce qui serait plus intéressant, ce serait de découvrir les causes de ce phénomène, ou du moins les circonstances prochaines de son apparition : c'est presque toujours le hasard qui l'a fait naître. On ne le connaîtra vraiment bien que lorqu'on saura passer sûrement de la variété colorée à la variété incolore, et réciproquement.

Dx.

H. Scholl. Sur le poison du choléra. *Prag. Med. Wochenschr.*, 1890, n° 44.

M. Scholl a cherché, dans la voie ouverte par son maître, M. Hueppe, l'influence que pouvaient avoir sur la production du poison cholérique, la culture à l'abri de l'air et dans un milieu appro-

prié. Il a cultivé le vibrion du choléra dans des œufs, dont il retrouvait, au bout de 18 jours de culture, l'albumine liquéfiée et de couleur gris jaunâtre, tandis que le jaune avait une teinte noire et une consistance presque solide. Délaissant ce jaune, il n'a étudié que l'albumine, de laquelle il n'a réussi à retirer aucune substance à sels cristallisables, pouvant être considérée comme une ptomaïne, soit qu'il ait employé la méthode de Baumann et Udransky, soit celle de Brieger.

Cette albumine était pourtant toxique, plus toxique qu'un produit quelconque de culture au contact de l'air, car si on en injectait 5cc dans le péritoine d'un cobaye, on voyait apparaître, aussitôt après l'injection, la paralysie d'abord des extrémités antérieures, puis des extrémités postérieures ; après 15 minutes se manifestaient des crampes d'abord légères, puis de plus en plus violentes dans les membres; l'animal se refroidissait, ses poils se redressaient et il mourait 40 minutes après l'injection. L'autopsie montrait un exsudat incolore dans le péritoine, une injection notable des vaisseaux sanguins de l'estomac et de l'intestin grêle, une hypérémie notable des reins, et le cœur arrêté en diastole.

Pour tâcher d'isoler la substance active, l'albumine a été coulée goutte à goutte dans 10 fois son poids d'alcool absolu. Le précipité formé tombe en partie au fond, et va en partie à la surface. On ne devine pas bien pourquoi M. Scholl sépare et étudie à part ces deux parties du précipité. La portion qui monte à la surface y est, selon toute apparence, entraînée par les bulles d'air qui se dégagent au moment où l'alcool absolu se dilue, et rien n'autorise à croire qu'elle soit absolument différente de celle qui se réunit au fond du vase.

Quoi qu'il en soit, la couche superficielle isolée se redissout facilement dans la potasse, d'où l'acide acétique la précipite de nouveau sans qu'elle puisse se dissoudre dans un excès d'acide. Elle se dissout aussi dans une solution à 7 0/0 de sel marin. La solution donne la réaction du biuret et de l'acide xanthoprotéique, mais aucun précipité avec l'acide acétique et le ferrocyanure de potassium. En appliquant avec recueillement les formules du *Credo* en honneur sur ces matières, M. Scholl en fait une *globuline*. C'est un point sur lequel nous ne le chicanerons pas. Les microbiologistes croient trop aux chimistes, faute d'avoir assez fait le tour de leurs idées, et de même les chimistes pour les microbiologistes. Il est bon de saupoudrer d'un peu de scepticisme les plats qu'on consomme et même ceux qu'on prépare, et la science se serait évité bien des déceptions pénibles en se souvenant dans ces derniers temps de cette règle de conduite.

Ce qu'il y a de plus intéressant que cette question de nom, c'est que quelques centimètres cubes d'une solution de cette substance dans de la potasse étendue, injectés dans le péritoine d'un cochon d'Inde,

amènent après quelques minutes des crampes des extrémités, et tuent l'animal en 20 minutes, avec cœur arrêté en diastole, exsudat séreux dans le péritoine, et reins, estomac et intestin grêle intacts en apparence. Cette globuline, dit M. Scholl, est donc toxique; c'est une *toxo-globuline*.

Arrivons maintenant au dépôt tombé au fond du vase. On le recueille sur un filtre, on le lave à l'alcool, et on le laisse digérer 20 minutes avec de l'eau à 40°. Il s'en dissout très peu, et pourtant, en injectant dans le péritoine d'un cobaye 8cc du liquide filtré, on voit la paralysie apparaître aussitôt après l'injection, et l'animal mourir quelquefois en 2 ou 3 minutes. A l'autopsie, on trouve le cœur en diastole, les reins hypérémiés, un exsudat sanguinolent dans le péritoine et une forte injection des vaisseaux de l'intestin. En diluant la liqueur injectée, la période de paralysie devient plus apparente. Elle est suivie de convulsions rythmiques des extrémités, et la mort tarde plus ou moins à venir, mais jamais plus de 3 heures. Un autre point à remarquer, c'est que cette solution avait une puissance toxique supérieure à celle de l'albumine originelle. « Tandis qu'avec l'albumine d'un seul œuf, on pouvait tout au plus tuer 5 à 6 animaux dans l'espace de 2 à 3 heures, on pouvait, avec la solution de toxine provenant de l'albumine d'un seul œuf, tuer 10 animaux mourant en 10 minutes. »

L'étude chimique de cette solution a montré qu'elle donnait la réaction du biuret et de l'acide xanthoprotéique, mais ne fournissait aucun précipité avec l'acide acétique et le ferrocyanure, ni quand on la saturait par le sulfate d'ammoniaque ou le sulfate de magnésie. Comme elle était précipitée d'un autre côté par le sublimé, le nitrate de mercure, la solution de tannin et l'acide phosphomolybdique, M. Scholl la considère comme contenant une peptone, une *choléra-toxopeptone*.

Voilà donc cette malheureuse confiance dans la chimie qui pousse M. Scholl à voir deux toxines différentes dans les produits des vibrions du choléra, alors que s'il était resté simple physiologiste, il n'aurait probablement pensé à n'en voir qu'une, agissant avec des symptômes et une rapidité variable, suivant la dose injectée et sa plus ou moins facile résorption. Il aurait au moins pensé à faire pathologiquement la preuve de cette dualité; mais point : il se rejette sur la Chimie, ignorant que si la question des toxines est l'obscurité, la question des matières albuminoïdes est la nuit profonde, et qu'on n'éclaire pas les ténèbres par les ténèbres.

Ce qu'il y a de piquant, c'est qu'il démolit lui-même sa construction en étudiant l'influence de la chaleur sur sa substance toxique, qui perd toute activité après une demi-heure de chauffage à 100°. Une

demi-heure de chauffage à 75° n'a pas d'effet, mais pour une durée plus longue, le poison est détruit. Or les peptones ont pour caractère de résister à l'ébullition. Elles sont aussi assez stables, tandis que la toxine de M. Scholl ne résiste pas à la dessiccation dans le vide à 40° ou 45°.

Mais ces critiques, qui ne portent que sur des questions d'interprétation, ne visent pas le fond du travail, pour lequel M. Scholl réclame légitimement le mérite d'avoir appris à préparer, au moyen de la bactérie du choléra menant une vie anaérobie dans l'albumine, une matière toxique amenant des symptômes plus voisins des symptômes du choléra chez l'homme que toutes celles qui avaient été décrites jusqu'ici. Faisant suite aux recherches de Hueppe et Wood sur le même sujet, celles de M. Scholl fournissent un argument nouveau dans la controverse entre l'École de Munich et l'École de Berlin que nous avons résumée dans une revue récente. (V. ces *Annales*, t. IV, p. 299.)

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de la rage.

BIREBENT Jules, 21 ans, maréchal-ferrant, à Pamiers, Ariège. Mordu le 10 octobre 1890, par un chien reconnu enragé par M. Mire, vétérinaire sanitaire ; 1° à l'avant-bras droit, quatre blessures ; 2° au pouce gauche, deux blessures ; toutes sont pénétrantes et ont beaucoup saigné. Birebent a été cautérisé au fer rouge par un médecin un quart d'heure après la morsure. Il a été traité du 14 octobre au 2 novembre.

Le 29 novembre, Birebent est pris de malaise, les cicatrices des blessures du poignet et de l'avant-bras droit gonflent et prennent une teinte livide. Il succombe à la rage convulsive le 1er décembre. (Renseignements fournis par le docteur Allana.)

ERRATUM. Dans le dernier article de M. Winogradsky, t. IV, p. 767, 4e ligne de la note, lire *dosables* au lieu de *considérables*.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — DÉCEMBRE 1890.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	»	2	»	»	»	»	»	»
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	2		»	»		»	»	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	»	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	9	20	»	14	28	»	2	9
Morsures aux mains — multiples	»	11		»	14		»	7	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	5	»	»	12	»	»	6	»	»
Pas de cautérisation	15	»	»	15	»	»	3	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	»	6	»	11	22	»	3	7
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	6		»	11		»	4	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	2	»	»	15	»	»	4	»	»
Pas de cautérisation	4	»	»	7	»	»	2	»	»
Habits déchirés	6	»	»	19	»	»	6	»	»
Morsures à nu	»	»	»	3	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	3	3	»	1	1		»	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	2	»	»	1	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	»	»	»	»	»	»
Habits déchirés	1	»	»	»	»	»	»	»	»
Morsures à nu	3	»	»	1	»	»	»	»	»
Totaux. **Français et Algériens**		31	31		45	51		14	16
Totaux. **Etrangers**		»			6			2	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					98				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 93 fois; chats, 5 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. FÉVRIER 1891. N° 2

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

DES RACES DU BACILLE PYOCYANIQUE

PAR M. C. GESSARD.

Travail du laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne,
à l'Institut Pasteur.

J'ai étudié dans un précédent mémoire [1] la fonction chromogène du bacille pyocyanique. J'ai montré qu'il produisait plusieurs pigments, et que la nature du pigment variait pour un même germe avec la composition du milieu où ce germe était implanté. Mes recherches portaient sur un organisme que j'avais isolé d'un pansement ; l'étude parallèle de deux autres organismes d'origines différentes me permit d'attribuer quelque généralité à mes conclusions. J'ai dû me demander pourtant dans quelle mesure le rapport que j'avais établi entre le milieu nutritif et le pigment était constant et nécessaire, et pouvait être étendu à tous les germes de quelque provenance qu'ils fussent ; si des exceptions ne pouvaient pas se produire spontanément ou être artificiellement provoquées, et se perpétuer ensuite par voie de descendance. En un mot, peut-il exister des races du bacille pyocyanique ? Mais avant d'exposer les faits qui répondent à cette question, il ne me paraît pas sans utilité de revoir rapide-

1. Ces *Annales*, t. IV, p. 88.

ment comment la notion de race s'est développée en microbie, quels attributs des espèces microbiennes sont susceptibles de variations, et quelle est la nature de ces variations dont la transmission héréditaire constitue la race au sens habituel du mot.

I

La notion de race a été introduite en microbie par M. Pasteur, dans ses *Études sur la bière*, à propos des diverses sortes de levures alcooliques qui s'offraient à son observation. M. Pasteur n'a pas donné de noms particuliers à ces diverses levures, craignant d'attacher trop d'importance aux caractères extérieurs, et « ayant constaté maintes fois que des formes, en apparence distinctes, appartiennent souvent à une même espèce [1] ». Ces variétés morphologiques, reconnues ainsi dans l'espèce dès le début de la science nouvelle, eussent pu servir sans doute à l'établissement de races. Mais la race, ainsi que l'espèce, doit être fondée sur d'autres bases que les caractères extérieurs. « Des formes semblables peuvent aussi cacher des différences profondes [2] ». Et l'œuvre entière de M. Pasteur fonde d'abord sur la connaissance des fonctions physiologiques la distinction des organismes microscopiques. Cet élément primordial de diagnose microbienne dans l'œuvre de M. Pasteur est invoqué pour les levures, dès la note sur *quelques faits nouveaux au sujet des levures alcooliques*, dans le Bulletin de la Société chimique, 1862, p. 74. Il faut, dit l'auteur, suivre avec attention « la durée de la fermentation, les proportions des substances qui prennent naissance, si l'on veut arriver à quelques conclusions certaines au sujet de l'identité ou de la différence des diverses levures alcooliques ». Ce sont les fonctions physiologiques plus que les caractères morphologiques, qui distinguent la levure haute et la levure basse de brasserie, provenant d'un germe unique peut-être, et offrant « un exemple nouveau de ces modifications de plantes ou de races d'animaux, devenues héréditaires par une domestication prolongée [1] ». Voilà formulée la conception de race. Elle se précise

1. *Etudes sur la bière*, p. 148.
2. *Ibid.*
3. *Ibid.* p., 185.

plus loin en quelques lignes où est contenu un plan d'études qui sera étendu des levures à toutes les espèces microbiennes. « Une levure est une réunion de cellules qui ne sauraient être individuellement identiques. Chacune de ces cellules à des propriétés d'espèce ou de race qu'elle partage avec les cellules voisines, et, en outre, des caractères propres qui la distinguent, et qu'elle est susceptible de transmettre dans des générations successives. Si donc on parvenait à isoler, dans une levure déterminée, les diverses cellules qui la composent, et qu'on pût cultiver à part chacune d'entre elles, on obtiendrait un nombre égal de levures qui, vraisemblablement, seraient distinctes les unes des autres, parce qu'elles participeraient chacune des propriétés individuelles de leur cellule d'origine... Ce serait probablement un moyen de créer des races de levures distinctes[1]. »

La découverte française de l'atténuation des virus a réalisé la création de races aux dépens des bactéries pathogènes. Le microbe du choléra des poules peut être pris à un stade quelconque de l'atténuation due à l'oxygène de l'air, et transmettre à des générations successives le degré de virulence où il était parvenu, et qui est la seule caractéristique de la race ainsi formée. M. Pasteur s'est assuré[2] « qu'il n'existe pas de correspondances morphologiques entre le parasite et les diverses virulences qu'il accuse ; les cultures sont pareilles pour toutes les virulences ». Nous pouvons ajouter tout de suite qu'elles semblent aussi avoir les mêmes besoins nutritifs. Avec la bactéridie charbonneuse, les virulences diverses sont fixées dans la spore, et la stabilité des races correspondantes est ainsi assurée dans le temps, sans qu'il soit besoin de les laisser en contact avec les agents qui leur ont donné naissance.

Mais la virulence d'un microbe n'est pas une propriété au sens strict du mot; c'est un fait d'ordre complexe, où est impliqué un autre être vivant que le microbe. Elle naît du conflit de ces deux organismes vitaux : elle est la résultante de leur réaction réciproque. De cette notion sont résultés de nouveaux caractères distinctifs. Avec le choléra des poules, le charbon, tous les animaux adultes d'une même espèce se comportaient à peu près

1. *Études sur la bière*, p. 193 et 194.
2. *Comptes rendus*, 1880, t. XCI, p. 677.

de la même façon, et donnaient la même mesure pour la virulence du microbe et l'étude de ses variations. Le rouget du porc fit intervenir la considération de la race même dans l'espèce animale employée à cet effet. C'est dans cette dépendance étroite de la forme, du milieu de culture du microbe, du milieu vivant où il est introduit, que la distinction des races s'est établie d'après les virulences variables des microbes pathogènes.

Les caractères extérieurs ont pu servir aussi, plus tard, à l'établissement de races. Les espèces chromogènes en ont fourni les premiers exemples. La fonction dont la persistance doit fournir dans ce cas le point de repère de la diagnose spécifique est ici facile à vérifier, puisque c'est la production d'une coloration corrélative et synchrone au développement même de la culture *in vitro*. Cette fonction peut être atteinte alors que la forme subsiste. Mais pour constituer des races, ces variations doivent toujours se retrouver dans le milieu originel où la forme et la fonction sont normales.

Dans les cas de dégradation profonde et simultanée de la forme et de la fonction, le caractère de race ne sera plus reconnu qu'autant que, par un artifice quelconque, on pourra, ou ressusciter la fonction dans des conditions nouvelles, ou amener le microbe à la reproduire dans les conditions habituelles. En dehors de ce cas, c'est l'espèce même dont l'identité devient incertaine, il n'y a quasi rien à répondre au soupçon d'une substitution accidentelle dans la série des expériences qui ont conduit du microbe originel à un microbe qui n'a rien conservé de ce qui constituait son ancienne individualité.

II

La question de l'existence de races du bacille pyocyanique comporte mieux qu'une solution théorique, depuis les travaux de Wasserzug, parus dans ces *Annales*[1]. Les recherches de Wasserzug ont porté successivement sur la fonction et la forme. Il a montré qu'on peut « abolir d'une façon permanente la fonction productrice de matière colorante, dans les milieux pour lesquels

1. T. I et II.

cette fonction est normale ». D'un autre côté il a pu « modifier la forme assez profondément pour que le microbe, rapporté dans son milieu originel, y prenne et y conserve une forme différente de la forme primitive ». C'est le bouillon qui servait à ces cultures. Le bouillon est resté le milieu banal offert au développement des microbes. Ce liquide ne facilite guère, à la vérité, l'analyse des conditions physico-chimiques du développement; avec lui, on ne fait que substituer aux milieux physiologiques, où s'entretient d'habitude l'activité cellulaire, un milieu qui, pour être artificiel, n'est pas moins complexe, et dont la composition n'est guère mieux connue. Mais, à raison de cette complexité même, le bouillon fournit aux besoins variés des divers microbes et aux substances diverses qu'ils élaborent. J'ai montré qu'ainsi le bacille pyocyanique y donne naissance simultanément à deux pigments, qu'il ne produit qu'isolément et à l'exclusion l'un de l'autre dans d'autres milieux moins complets. C'est aussi la réaction pigmentaire du bouillon qui distingue les races que je vais décrire. Des propriétés de race rendent seules compte des variations des effets dans un milieu invariable.

III

Je rappellerai d'abord les caractères que j'ai reconnus au germe qui peut être pris pour type de la race la plus parfaite, du bacille pyocyanique normal, et que, pour abréger, je désignerai par la lettre A.

La culture dans le bouillon donne à la fois pyocyanine et fluorescence verte. Cette dernière apparaît seule dans les cultures dans l'albumine d'œuf. Les milieux, peptone et gélatine, l'excluent au contraire, et la pyocyanine y prédomine, accompagnée d'un pigment verdâtre. L'addition de glucose à ces derniers milieux supprime la pyocyanine, et laisse se développer seul ce troisième pigment.

J'ai cherché si, en réduisant le microbe à la fonction que j'appellerai fluorescigène, pendant un long temps et pour des générations nombreuses, il ne serait pas possible de le rendre inapte à produire de la pyocyanine dans les milieux favorables à la production du pigment bleu. Le résultat a été tout différent.

La culture en série dans l'albumine a compris trentre-quatre passages échelonnés sur plus d'une année. Le microbe a été ensuite reporté dans le bouillon. Comme s'il était alors devenu, par l'habitude, plus exigeant sur l'état où doivent lui être offerts les éléments de la production de fluorescence, c'est la fonction pyocyanogène qui a prévalu, et qui subsiste seule après quelques passages en bouillon. C'est l'origine de la race que je désignerai par la lettre P.

En revanche la chaleur a donné le résultat que j'avais demandé en vain à l'éducation en milieu albumineux. Une culture dans le bouillon de la race A, après cinq minutes de chauffage à 57°, n'a donné que de la fluorescence par ensemencement dans un matras de bouillon, premier terme d'une série de cultures où la fonction fluorescigène seule persiste. C'est la race F.

La sensibilité de la fonction pyocyanogène à l'action de la chaleur peut servir encore à créer une autre race. Reprenons la race P, qui n'est apte à produire que de la pyocyanine, et portons de même une de ses cultures dans le bouillon à la température de 57°, pendant cinq minutes. Employons-la ensuite à ensemencer un nouveau bouillon. Il n'en résulte qu'un trouble : le développement du microbe a lieu sans production d'aucun pigment. C'est une race sans pigment S, comme celle que Wasserzug avait obtenue de l'emploi des antiseptiques.

Nous possédons ainsi quatre races de bacille pyocyanique :

A, qui donne pyocyanine et fluorescence.
P, qui donne pyocyanine seule.
F, qui donne fluorescence seule.
S, ni fluorescence, ni pyocyanine.

La culture dans le bouillon ne distinguerait donc plus le microbe de la race S du groupe nombreux des bactéries sans pigment. La race F, quoiqu'elle ait retenu une fonction chromogène, ne se garderait pas mieux de la confusion, en présence du grand nombre de microbes producteurs de fluorescence. Mais soumettons les deux organismes à l'épreuve du milieu gélose-peptone glycérinée, que j'ai reconnu si favorable à la production de pyocyanine. Le caractère spécifique de nos microbes va s'y retrouver, la fonction pyocyanique reparaître. La couleur bleue

ne diffère même pas en intensité de celle qu'on obtient dans le même milieu avec les races A et P.

Des phénomènes de coloration, de tous les plus faciles à distinguer, montrent ainsi d'une manière frappante ce qui ne peut être méconnu dans aucun phénomène d'origine microbienne, l'influence respective du microbe et du milieu, la subordination de l'effet à cette condition élémentaire de leur réaction réciproque, que le milieu fournisse certains éléments que le microbe doit être apte à utiliser.

L'aptitude du microbe peut être abolie d'une manière définitive, et ne se réveille pas alors dans les conditions de milieu les plus favorables : c'est ainsi que dans l'albumine même, plus propre que le bouillon à entretenir la fonction fluorescigène, les germes P et S se développent sans plus donner de fluorescence. Nous venons de voir, au contraire, pour la fonction pyocyanogène, l'aptitude des races F et S, abolie dans le bouillon, reparaître dans la gélose-peptone glycérinée.

C'est sous la réserve de ces aptitudes fonctionnelles où les races se différencient, que la distinction entre les milieux subsiste telle que je l'ai établie, et se résume ainsi pour le bacille pyocyanique : l'albumine et le bouillon sont nécessaires à la fonction fluorescigène, mais n'excluent pas la fonction pyocyanogène ; la peptone exclut la première fonction d'une façon absolue et convient particulièrement à la seconde.

IV

On est fondé à attribuer à ces modifications de propriétés du bacille pyocyanique un sens général d'affaiblissement, de diminution, soit que l'on considère l'agent employé, la chaleur, et ses effets habituels, soit que l'on considère le microbe, dont il est naturel de regarder comme des types dégradés les races à un seul pigment ou sans pigment, et pour qui, d'ailleurs, ces modifications s'obtiennent au voisinage immédiat du degré de température qui supprime même sa vitalité : aucune race, en effet, n'a résisté à la température de 59° pendant cinq minutes. Mais cette conclusion, est-il besoin de le dire ? ne va pas au delà de la fonction pigmentaire du bacille, à laquelle se borne actuellement mon

étude : le chauffage à 57°, qui l'avait réduit à la production de fluorescence, avait laissé sa virulence au même point, comme en témoigna une expérience comparative sur le lapin avec les races A et F.

Les moyens varient d'obtenir les résultats que j'ai mentionnés, et ne laissent pas place à une interprétation différente de ces résultats. Ainsi, une race sans pigment a été obtenue aux dépens de la race F, en mettant à profit une modification spontanée dans ses cultures, un affaiblissement de la couleur dont il serait difficile de dire la cause, dû, peut-être, à un changement de bouillon (il n'en est pas deux qui se ressemblent), à une différence légère de température, chose fréquente dans une étuve commune, etc. La dégradation a pu se suivre ici, pour ainsi dire pas à pas, par la faiblesse croissante de la réaction pigmentaire dans les cultures successives, que je renouvelai à de courts intervalles, jusqu'à l'abolition définitive de la fonction chromogène.

Dans une autre expérience, c'est la fonction fluorescigène qui s'arrête à un degré de l'échelle de déchéance qu'elle descend sous l'influence de la chaleur. Un degré de plus que la température qui a produit la race F aux dépens de A, 58°, appliqué pendant 5 minutes à une culture de F dans le bouillon, l'a amenée au point de ne plus développer de pigment dans ce milieu, où elle se confondrait désormais avec les races incolores déjà obtenues. Mais transportons-la dans le même milieu solidifié par la gélose. Les bacilles fluorescents en général, témoignent de la supériorité de cette gélose au bouillon sur le bouillon ordinaire pour favoriser leur fonction. La nouvelle race la vérifie à son tour par la production de fluorescence, ce qui prouve chez elle une déchéance moins profonde que celle de la race S, qui reste incolore dans les deux milieux.

La fonction fluorescigène résiste donc mieux à la chaleur que la fonction pyocyanogène. Mais elle n'en est pas moins détruite finalement, et pour le milieu même qui réalise les conditions les plus favorables à sa production. La fonction pyocyanogène, au contraire (et ceci est bien fait pour lui maintenir le premier rang dans la biologie du microbe), se retrouve dans le bacille, même dépouillé par la chaleur de toute fonction chromogène en bouillon. Dans son milieu approprié, elle ne se sépare pas de l'évolution vitale du bacille.

V

Les effets obtenus sur le bacille pyoycanique sont donc de l'ordre de ceux qu'on réalise habituellement *in vitro*, et qui ont l'atténuation pour expression commune et pour cause la dégénérescence vitale. Peut-on remonter ces types dégénérés, rendre une des fonctions chromogènes aux races sans pigment, la fonction abolie à celles qui n'en possèdent plus qu'une? Les tentatives dans ce sens, *in vitro*, sont demeurées infructueuses. Si les diverses étapes de la déchéance fonctionnelle sont facilement parcourues dans les expériences de laboratoire, en concurrence dans ce cas avec le procès vital, la marche inverse, le rétablissement dans son intégrité de la fonction déchue, ne s'obtient guère qu'avec l'aide de la vie, par la culture des microbes dans un milieu vivant. J'étais ainsi conduit à étudier ce que deviennent les différentes races dans le corps des animaux.

Ces expériences se poursuivent. J'en mentionnerai deux seulement. L'une a trait à la race A. Elle a subi sous l'action de l'organisme la même modification que par l'action de la chaleur. Un lapin, du poids de 1,990 grammes, a reçu dans la veine de l'oreille un demi-centimètre cube d'une culture dans le bouillon, âgée de trois jours, et est mort en quarante-huit heures. Quelques gouttes de sang du cœur ont donné dans le bouillon une culture exclusivement fluorescente. La suppression de la fonction pyocyanogène s'est maintenue dans les ensemencements en série. Le même caractère appartenait à un germe que M. Metchnikoff m'a remis, provenant du passage par de nombreux lapins d'un bacille qu'il tenait de M. Charrin, et qui donnait bien de la pyocyanine, à l'arrivée dans son laboratoire.

Dans la seconde expérience, un lapin, du poids de 1,700 grammes, a reçu dans la veine de l'oreille un demi-centimètre cube d'une culture de la race P dans le bouillon, âgée de trois jours. La mort survient au bout de quinze jours. Quelques gouttes d'urine ont donné une culture sans pigment, et ce caractère se maintient tel dans les cultures successives. L'identité du bacille pyocyanique a été vérifiée dans les deux cas par l'épreuve sur gélose-peptone. Les races A et P ont donc subi

du passage dans l'organisme du lapin la même altération que de l'action de la chaleur.

Voici en résumé les races que je possède et les conditions de leur production :

Race type, à fluorescence et pyocyanine, venant d'un pansement ;
— fluorescigène, par chaleur sur la race type ;
— — par passage de la même dans le lapin ;
— pyocyanogène, par culture en albumine de la race type ;
— sans pigment, par dégradation spontanée de la race pyocyanogène ;
— — par chaleur sur la même ;
— — par passage de la même dans le lapin ;
— — par chaleur sur la race fluorescigène.

On imagine aisément des types de races intermédiaires. Ils pourraient être obtenus. par exemple, dans l'action lentement modificatrice de l'albumine sur le microbe, suivant le chiffre de la série auquel on emprunterait la semence à reporter dans le bouillon.

La morphologie ne fournit pas de caractères distinctifs entre ces différentes races. On peut noter une tendance aux formes longues de filaments flexueux. pour les races sans pyocyanine en gélatine-bouillon. Mais c'est un caractère transitoire qui s'atténue ou disparaît par retour en milieu liquide. Je n'insisterai pas davantage sur l'aspect des colonies dont on a décrit la forme rayonnée. les fins prolongements radiés ; ni sur la liquéfaction de la gélatine dont on étudie si minutieusement la durée. l'aire de progression, etc. Les colonies ont été rayonnées ou festonnées pour un bouillon, arrondies pour un autre, rondes généralement. et quelle que fût la race, pour les milieux gélatine, gélatine-peptone. Peut-être les races sans pyocyanine liquéfient-elles plus vite. Ce sont des faits sans importance. Il est plus intéressant de noter que les cultures de ces dernières sont dépourvues de l'odeur aromatique, qui appartient, au contraire, aux races P et A.

VI

On conçoit que les résultats que j'ai obtenus dans des conditions déterminées, pourront dépendre de conditions différentes, ou réglées par l'expérimentation, ou réalisées

dans les conditions naturelles d'apparition du bacille pyocyanique. Le milieu gélose-peptone glycérinée permettra, dans tous les cas, de retrouver la réaction caractéristique de l'espèce, pour les variétés nombreuses que peut offrir cette dernière.

Dans les recherches physiologiques, c'est un germe qui, inoculé à un animal et reporté de son corps dans un milieu de culture, peut donner, comme nous l'avons vu, une réaction pigmentaire différente de celle qu'il offrait d'abord et qui le ferait confondre avec d'autres germes ; on verra parfois le résultat varier suivant l'humeur de l'animal en expérience à laquelle la semence est empruntée, et même suivant la portion ensemencée de cette humeur[1].

En clinique, c'est fréquemment l'odeur caractéristique qui fait diagnostiquer la présence du bacille pyocyanique, sans qu'il se révèle par une coloration manifeste. Ce sont les différentes races qui peuvent se rencontrer dans les différents pansements bleus, ou dans un même pansement[2], selon les parties qui seront ensemencées. Quelque circonstance semblable a favorisé mes premières recherches, où le microbe, que je cultivai dans la salive, ne donna que de la pyocyanine dans ce milieu si propice à la fluorescence[3]. On expliquerait par les mêmes causes les divergences entre les observateurs de Berlin et de Breslau et ceux de Heidelberg sur les caractères du bacille pyocyanique[4]. Si, comme il est vraisemblable, le bacille α de M. Ernst ne repré-

1. J'ai ensemencé deux matras du même bouillon avec nombre égal de gouttes d'urine du lapin dont le sang m'a donné une race fluorescigène. L'un des matras a montré pyocyanine et fluorescence, l'autre, fluorescence seulement ; mais la pyocyanine a reparu dans le nouveau matras qu'il a servi à ensemencer.

2. Cette vue doit être préférée. Elle est plus conforme à la vérité et plus suggestive. Elle revient à l'idée pastorienne de l'individualité de chaque cellule de levure. Elle conduit Wasserzug (*loc. cit.*) à poursuivre des cultures homogènes, c'est-à-dire, « dont toutes les cellules soient capables de produire le pigment dans un milieu donné. » Mais il reconnaît aussi vite la vanité de l'entreprise, des différences individuelles se produisant de nouveau et s'accentuant à mesure que la culture vieillit.

3. J'étais d'autant plus apte à reconnaître ce phénomène de la fluorescence, dès cette époque, et attentif à son apparition, que j'avais débuté en microbie par l'étude d'une espèce fluorescente, et que, dans mes idées d'alors, j'eusse imputé la fluorescence à une altération de mes cultures par cette espèce. C'est ce que j'ai fait, d'ailleurs, quand, ayant emprunté à un autre pansement la semence pour une culture à l'air libre en milieu albumineux, j'ai vu apparaître une fluorescence que j'ai attribuée à un bacille banal, alors qu'elle pouvait appartenir à un bacille pyocyanique fluorescigène. (De la pyocyanine et de son microbe. Appendice. Note 1.)

4. Voyez mon mémoire précédent.

sente qu'une race à fonction fluorescigène prédominante, il doit reproduire de la pyocyanine dans les conditions de milieu spécial que j'indique.

Enfin, c'est dans le corps de l'homme même[1] qu'on doit s'attendre désormais à rencontrer le bacille pyocyanique, et qu'il faut être prêt à le reconnaître sous les modifications qu'il peut éprouver dans ce nouveau milieu, et sous la diversité des symptômes qu'il y provoque. Les recherches que je viens d'exposer auront ajouté peut-être aux éléments de diagnostic de cette espèce microbienne.

Elles conduiront sans doute à une autre conséquence. On trouve souvent encore dans les travaux de microbie la mention d'un bacille du pus vert. La spécificité, que cette dénomination implique, me paraît sujette à caution. Le phénomène qu'elle rappelle consiste en un vert fluorescent du produit sécrété. Ou le bacille en cause est une des races F du bacille pyocyanique, ce qu'on saura désormais reconnaître, et il n'est plus besoin d'un nom nouveau, ou c'est un des microbes fluorescents banaux dont on a multiplié les espèces en proportion des milieux divers où cette fonction banale trouve à s'exercer. Le nombre s'en réduira, et la spécificité au regard de chaque milieu tombera du même coup, quand on attachera moins d'importance aux caractères contingents de la forme, de l'aspect des colonies, de la liquéfaction de la gélatine, etc.

Je me crois d'autant plus autorisé à faire ces réserves, qu'ayant trouvé tout récemment, dans le laboratoire de M. Duclaux, une culture du *bacille du pus vert* qui venait de chez M. Hueppe, j'ai constaté que l'ensemencement de cette culture sur gélatine donnait une fluorescence verte sans mélange de bleu, mais que, sur gélose-peptone glycérinée, elle donnait de la pyocyanine.

VII

Les conclusions de cette étude et de mes études précédentes sont les suivantes :

1. Voyez *Semaine médicale*, 1890 : Ehlers, p. 211; Œttinger, p. 385; Neumann, p. 386; et Soc. de biologie, 26 juillet 1890, Charrin.

Le bacille pyocyanique a deux fonctions chromogènes [1] :

A. La fonction pyocyanogène, la plus importante en tant que caractéristique de l'espèce, dépend :

1° du milieu. Par rapport au type de l'espèce le plus parfait : l'albumine est réfractaire à la production de pyocyanine [2] ; le bouillon est indifférent, étant aussi bien approprié à l'autre fonction ; la peptone est le milieu le plus favorable.

2° du microbe. Par rapport au milieu d'épreuve habituel, le bouillon, on distingue plusieurs races : une n'a que la fonction pyocyanogène ; une autre race l'exerce concurremment avec la fonction fluorescigène ; des races en sont dépourvues, mais elle reparaît pour ces dernières en milieu gélatine-peptone glycérinée ; et d'un autre côté, par la culture en série du microbe dans le milieu réfractaire, elle est exaltée au point d'atteindre, par report dans le bouillon même, à la pureté et à l'intensité d'effets d'ordinaire spéciales à la peptone.

B. La fonction fluorescigène est commune au bacille pyocyanique et à plusieurs microbes.

L'albumine, le bouillon la favorisent. La peptone l'exclut.

Par rapport aux milieux favorables, elle est également dans la dépendance de la race.

Ainsi, en plus des questions de milieu, d'espèce, il faut faire acception de la question de race dans une espèce donnée.

Ce n'est pas une notion nouvelle. J'ai rappelé que l'atténuation des virus l'a établie anciennement dans la science. Les faits que j'ai exposés ne font que la confirmer et l'illustrer, si j'ose ainsi parler, de la clarté qu'apportent des jeux de couleurs nettement perceptibles à la vue.

Que l'on considère la fonction en microbie aussi bien sous le

1. Je laisse ici de côté le troisième pigment. Non que mes expériences nouvelles en aient infirmé l'existence. Mais elles n'en ont pas avancé l'étude. Ses rapports avec la pyocyanine doivent être approfondis. Je l'ai toujours retrouvé avec cette dernière, quand la fluorescence n'existait pas, par conséquent avec la race P dans tous les milieux ; avec la race A, en peptone, en gélatine.

2. Je répéterai que l'albumine n'exclut pas la production de pyocyanine. Dans la longue série de mes cultures en albumine d'œuf, j'ai vu quelquefois survenir le pigment bleu, mais au bout d'un temps fort long. Je n'ai jamais employé dans ces passages que des cultures qui n'en contenaient pas trace. Or certains ensemencements sont espacés de trois semaines.

point de vue pathogène que sous le point de vue chromogène, le sens des constatations n'en sera pas affecté. On peut, par un rapprochement légitime, assimiler à une infection cette propagation de la couleur bleue par un contage vivant. Inégale réceptivité des milieux, virulence variable des races, accrue en milieu réfractaire, tels sont les traits principaux de cette infection bleue, et qui sont communs aux autres infections.

Le résumé de cette étude tient dans cette formule générale :

Les effets observés pour une espèce microbienne varient avec les milieux, et dans un milieu donné avec les races que comporte toute espèce.

Note. — Le réactif gélose-peptone est rapidement préparé comme il suit. La gélose, finement hachée, est introduite à la dose de 0 gr. 25 dans chaque tube à essai. On ajoute 5^{cc} de solution de peptone neutre à 2 %, 5 gouttes de glycérine. On doit avoir la précaution de maintenir les tubes quelque temps au bain-marie bouillant, avant de les soumettre à l'autoclave, pour éviter le brusque dégagement de l'air emprisonné dans la gélose, d'où peut résulter une projection, tout au moins une souillure du bouchon d'ouate. On stérilise ensuite à 120° pendant cinq minutes. Les tubes sont mis à refroidir horizontalement.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES EAUX D'ALGER

PAR M. PÉRÉ, PHARMACIEN-MAJOR DE 2e CLASSE.

La fièvre typhoïde est endémique à Alger; chaque année, pendant les mois d'août, de septembre et d'octobre, elle revêt un caractère plus sévère par le nombre comme par la gravité des cas que l'on observe. Elle frappe la population militaire, d'une si grande réceptivité pour les maladies infectieuses, comme la population civile.

Bien que les causes soient par ailleurs nombreuses qui permettent à Alger l'éclosion des maladies microbiennes et qui favorisent leur développement, je me suis demandé si la qualité des eaux alimentaires n'était pas l'un des facteurs essentiels de la constitution médicale de cette ville, si ces eaux ne seraient pas la cause première de l'affection typhique.

Je n'ai pas cru pouvoir, dans l'étude de cette question, me borner, comme on l'a fait souvent, à la recherche dans les eaux du bacille typhique ou en général des microbes d'origine surtout excrémentitielle; il ne me semble pas que le jugement à porter sur une eau potable soit une question que l'on puisse résoudre sans sortir de son laboratoire. Sans doute, quand on trouve dans une eau suspecte le *bacterium coli commune* en grand nombre, ou le bacille typhique, on peut prononcer contre cette eau une condamnation méritée; mais une eau où on ne trouve pas de microbes suspects n'est pas par cela seul une bonne eau; ils peuvent avoir échappé parce qu'ils sont rares ou qu'ils n'existent pas dans l'échantillon étudié. Dans ces cas, l'examen de l'origine de l'eau, de son mode de captation, de sa canalisation s'impose. C'est par examen que j'ai commencé, je vais en indiquer les résultats; je dirai ensuite comment j'ai cherché à éviter les causes d'erreur provenant de ce que les germes suspects peuvent être rares dans l'échantillon soumis à l'expérience.

I

ORIGINE DES EAUX D'ALGER, LEUR MODE D'ALIMENTATION. CANALISATION.

En principe, la ville d'Alger est alimentée par des eaux de sources. Le graphique n° 1 indique les points d'origine de ces eaux, ainsi que le parcours de la canalisation.

Fig. 1. — Alimentation des eaux d'Alger.

1° Eaux de Hamma : captées par une belle galerie située en face du jardin d'essai H^1. Altitude : 50^m. Le canal d'adduction, parallèle à la côte, longe un cimetière arabe et le champ de manœuvres. Elles desservent Mustapha-Inférieur et la ville basse.

2° Eaux du Télemly : point d'origine à Mustapha-Supérieur. Altitude 150^m. Desservent Mustapha-Supérieur et la ville moyenne.

3° Eaux de l'Aïn-Z'boudja : elles sont fournies par un système de sources situées sur le plateau argilo-calcaire qui s'étend d'El-Biar à Ben-Aknoun. Altitude : 200 à 250^m. Chacune de ces sources va rejoindre une canalisation principale qui amène ces

eaux au Réservoir du Sahel et de là au Réservoir de la Synagogue Z^2. Ces eaux prennent pendant l'hiver une large part à l'alimentation d'Alger.

4° Eaux de la Birtraria : leur canalisation est, en certain point, dominée par un cimetière arabe.

5° Enfin un aqueduc spécial amène à l'hôpital du Dey les eaux de l'Oued M'kacel prises vers leurs sources.

La quantité d'eau ainsi obtenue n'étant plus suffisante, la ville d'Alger exploite depuis quelques années une nappe d'eaux artésiennes, d'une profondeur de 52m à 56m, située à peu de distance de l'Oued el Harrach, entre les stations de Maison-Carrée et du Gué de Constantine. Ces eaux, dites *eaux de Bœnsh*, sont refoulées par deux machines élévatoires jusqu'au Réservoir de *Kouba*, d'où elles sont conduites à Alger par une canalisation tubulaire. Il n'en sera pas question dans cette étude, uniquement réservée aux eaux de sources énumérées ci-dessus.

Le graphique n° 2, indiquant le débit des sources principales,

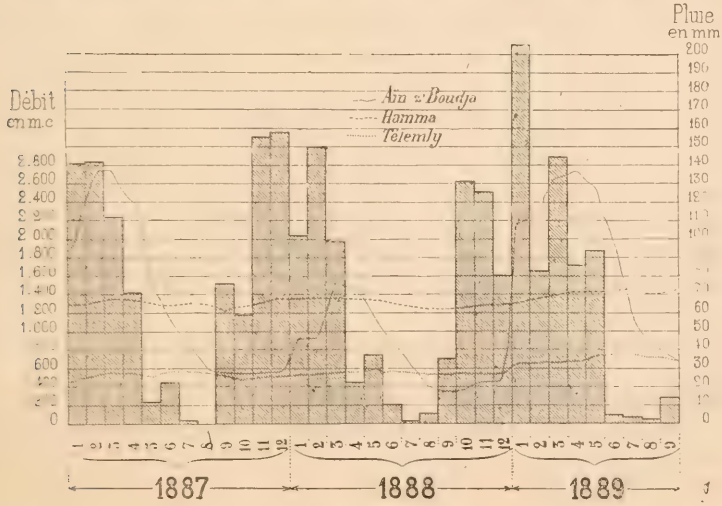


Fig. 2.

est intéressant à plus d'un titre, mais principalement pour les notions qu'il nous fournit sur le mode d'alimentation de ces sources. Les débits du Hamma et celui du Télemly y sont figurés par une courbe presque horizontale, ne subissant aucune influence saisonnière ; par leur constance, ils donnent ces eaux pour des eaux de profondeur, et partant pour des eaux pures à leur origine.

Il n'en est pas de même des eaux de l'Aïn Z'boudja dont la courbe, à oscillations brusques et de grande étendue, montre un débit irrégulier, suivant avec fidélité l'alternance des saisons, très faible pendant la saison sèche, très élevé pendant l'époque pluvieuse : caractère principal des eaux de surface, alimentées par les eaux pluviales n'ayant subi à travers le sol qu'une filtration rapide et insuffisante. D'ores et déjà, on peut conclure que ces eaux ont une origine suspecte. Il est vrai que la région au voisinage des sources est encore peu habitée, de sorte que le danger pourrait n'être aujourd'hui qu'hypothétique ; mais d'un moment à l'autre il pourrait devenir réel.

Les Algériens assurent que leurs eaux se troublent parfois pendant la saison des pluies. Personnellement, j'ai pu observer ce fait pour les eaux qui alimentent le Dey et pour celles de la Birtraria, de sorte que les sources du Hamma et du Télemly seraient seules des eaux de profondeur.

Pour toutes ces sources, la canalisation est la même, vicieuse en soi et présentant de nombreuses défectuosités [1]. Les canaux d'adduction sont en maçonnerie, souterrains dans presque tout leur parcours, pour la plupart de construction ancienne, et il est peu aisé de se rendre compte du degré d'étanchéité qu'ils possèdent encore. Ils sont munis de regards fermés par des pierres plates qui laissent s'infiltrer dans le canal ce qu'on dépose à leur surface, par exemple les excréments dont on les voit souvent couvertes. Quant aux réservoirs, celui de la Synagogue est fissuré à son faîte, et sur ce faîte repose la place Randon habitée par des marchands indigènes, d'une malpropreté repoussante.

L'hygiéniste rigoureux trouverait déjà des raisons suffisantes de condamnation, mais nous devons confirmer ce jugement préliminaire par quelques mesures précises qui prouvent le fait de la contamination de l'eau pendant son parcours.

Chlore. — Une eau bien captée doit avoir à toute distance de son origine une composition constante, sauf les changements

1. Les défectuosités de la canalisation furent constatées au mois d'octobre 1889 par une commission chargée de procéder « à l'analyse bactériologique des eaux d'Alger » ; elles furent signalées au conseil départemental d'hygiène par M. le Dr Trabut, rapporteur. Cette commission, composée de MM. Trabut et Soulié, professeurs à l'École de médecine, Langlois, chimiste expert, et Péré, pharmacien major, ne put faire la preuve bactériologique d'une pollution.

provenant des dépôts qu'elle laisse se former le long des parois qu'elle baigne. En particulier elle doit renfermer une proportion constante de chlore, que l'on peut choisir comme terrain d'étude, à la fois parce que sa détermination au moyen du nitrate d'argent, par le procédé de Mohr, est facile et rapide, et aussi parce que les chlorures sont au nombre des éléments que toute agglomération humaine laisse constamment s'écouler dans le sol. L'augmentation de la proportion de chlore le long de la canalisation est donc un argument en faveur de la contamination.

Voici les résultats trouvés pour les eaux d'Alger qui sont, comme on va le voir, très riches en chlore au départ, à cause du titre élevé de leur minéralisation [1].

Aïn Z'boudja. On a recueilli les eaux de l'Aïn Z'boudja au même moment à la caserne d'Orléans Z^1, à la Rampe Rovigo et au Réservoir de la Synagogue Z^2; elles ont donné pour un litre :

Caserne d'Orléans Z^1	82 milligr.	de chlore.
Rampe Rovigo.	94	—
Réservoir de la Synagogue	99	—

Hamma. Les eaux du Hamma, prises le même jour à la source et en un point de la canalisation distant de 3 km. environ, ont donné les résultats suivants :

Hamma, source, H^1.	83,6 milligr.	de chlore.
d° au point H^3.	92,3	—

Ainsi des infiltrations se produisent dans la canalisation, qui augmentent d'une manière très sensible la proportion de chlore dissous.

Matière organique. — On a évalué la quantité de matière organique par la proportion d'oxygène qu'elle emprunte dans des conditions identiques à une solution de permanganate de potasse.

Le procédé employé est celui qui a été recommandé par le Comité d'hygiène, et qui est pratiqué au laboratoire de Mont-

1. Résidu de l'évaporation desséché à 120°, pour un litre :

Oued M'kacel (Hôp. du Dey)	0gr 685	Eaux de la Birtraria.		
Hamma	0, 640	Chlore.	206	milligr.
Aïn Z'boudja.	0, 525	Ac. sulfurique	168	—
Télémly.	0, 566	Chaux.	203	—
Birtraria	1, 000	Magnésie	60	—

souris. Voici comment on l'appliquait : 200^{cc} d'eau étaient additionnés de 6^{cc} d'une solution à $\frac{1}{20}$ de bicarbonate de soude pur, et de 10^{cc} d'une solution de permanganate titrée, représentant par litre 160 milligrammes d'oxygène, soit 0,16 milligr. par centimètre cube. On chauffait progressivement et on maintenait l'ébullition pendant dix minutes. Après refroidissement on ajoutait 2^{cc} d'acide sulfurique pur, puis 4^{cc} d'une solution acide de sulfate double de fer et d'ammoniaque. Lorsque la liqueur était devenue transparente, on versait goutte à goutte avec une burette la solution de permanganate jusqu'à production d'une teinte rose sensible : soit n^{cc} le volume employé.

En même temps on opérait de même sur 400^{cc} d'eau, en réglant les deux foyers de chaleur de manière à obtenir l'ébullition au même moment dans les deux ballons; soit $(n + a)^{cc}$ le volume de la solution de caméléon nécessaire pour obtenir la même coloration rose : a^{cc} représente le volume de permanganate réduit par 200^{cc} d'eau, et $5a \times 0,16$ le poids, en milligrammes, d'oxygène emprunté par la matière organique que renferme un litre de cette eau.

Or, l'application de cette méthode à l'étude des eaux d'Alger montre que l'échantillon, pris en quelque point que ce soit, exige pour un litre moins de 1 milligramme d'oxygène, c'est-à-dire qu'un examen superficiel pourrait donner ces eaux comme très pures. Mais, en comparant les résultats obtenus en deux points différents, on voit que l'eau du Hamma emprunte à la solution de caméléon :

Prise à la source.	0,12	milligr. d'oxygène.
au point H^3.	0,20	—

Il y a donc, en général, dans les eaux d'Alger, très peu de matière organique attaquable par les réactifs suivant le procédé employé, mais cette quantité augmente lorsqu'on s'éloigne de la source : et ce fait confirme le renseignement que le dosage du chlore nous a déjà fourni.

On arrive à la même conclusion en étudiant la rapidité avec laquelle l'eau perd son oxygène sous l'influence des microbes qui s'y développent, lorsqu'elle est conservée au laboratoire dans des conditions déterminées. J'ai constaté que l'eau puisée en H^3 perdait ainsi, dans le même temps, deux fois plus d'oxygène à peu près que l'eau puisée à la source. Et on sait que, en

général, cette perte d'oxygène est d'autant plus rapide que l'eau renferme plus de matière organique. Mais les nombres ainsi obtenus ne peuvent pas, à cause de leur manque de précision, être mis au même plan que ceux relatifs au dosage du chlore ou de la matière organique.

Je me borne à remarquer que toutes ces mesures s'accordent à démontrer une infiltration organique le long de la canalisation.

II

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES

Les recherches qui précèdent m'ayant amené à conclure à une contamination des eaux le long de la canalisation, j'ai essayé de pousser la démonstration plus loin en recherchant dans ces eaux les organismes d'origine fécale les mieux connus, à savoir le *bacterium coli commune* et le *bacille typhique*.

Les procédés imaginés pour la recherche de ces deux microbes dans les eaux ont rendu de grands services. Malheureusement, ils ne permettent d'agir que sur une faible quantité de liquide. Même avec celui de M. Vincent, c'est de l'étude de quelques centimètres cubes de liquide qu'il faut conclure à l'ensemble d'une canalisation. Quand il y a beaucoup de microbes suspects ou dangereux, on peut les découvrir, et même, ce qui est avantageux parfois, les dénombrer assez exactement, grâce au fractionnement qui est dans les conditions de ces diverses méthodes.

Par contre, quand ces microbes sont rares ou irrégulièrement répartis, ils peuvent échapper à l'examen. J'ai donc pensé qu'à côté de ces méthodes excellentes, et en profitant de ce qu'elles nous ont appris, on pouvait en essayer une autre, qui permît d'opérer sur un volume de liquide beaucoup plus considérable, en subordonnant, en ce qui regarde les microbes, la question de quantité à la question de qualité.

Nombreux, en effet, sont les cas dans lesquels il s'agit moins d'apprécier dans quelles proportions des contaminations fécales sont faites, que de savoir si elles sont possibles, et où la constatation dans un litre d'eau de quelques microbes ayant cette origine aura, au point de vue pratique, une importance capitale. Ces microbes, quand ils se chiffrent par quelques unités, risque-

raient fort de passer inaperçus avec les méthodes en usage; on les mettra au contraire facilement en évidence par le procédé que je propose, et que j'ai déjà appliqué avec fruit à un grand nombre d'essais.

Voici le principe sur lequel il s'appuie.

L'eau suspecte est transformée en un terrain de culture suffisamment nutritif, dans lequel la présence d'une proportion déterminée d'acide phénique, sans empêcher la multiplication des germes du *Bacterium coli commune* et du *Bacille typhique*, met obstacle à celle des espèces étrangères, ainsi que l'a démontré la pratique des procédés usuels.

MODE OPÉRATOIRE. — Dans un récipient jaugé de 1 litre, stérilisé (matras ou ballon), on introduit 100^{cc} de bouillon de bœuf normal [1], neutre et stérile; 50^{cc} d'une solution de peptone pure à 10 %, également neutre et stérilisée; et 600 à 700^{cc} de l'eau à analyser. On ajoute alors 20^{cc}, exactement mesurés, d'une solution d'acide phénique pur à 5 %, et on emplit jusqu'au trait de jauge avec l'eau suspecte. Le liquide obtenu, que j'appellerai liquide A, contient donc par litre un gramme d'acide phénique et 830^{cc} d'eau suspecte.

On le répartit en dix vases stérilisés, fioles, ballons ou matras, munis de leurs bouchons d'ouate, et on le porte à la température moyenne de 34°. Il ne faut pas dépasser 36°; on risquerait, par l'application un peu soutenue d'une température plus élevée, d'atteindre trop vivement les microbes que l'on recherche, et de stériliser le terrain. La température de 32° à 36° est très convenable.

Un trouble se produit dans le cas d'une eau polluée par les espèces susdites, non pas à heure fixe, mais d'autant plus vite que la pollution est plus forte, et que la température s'est maintenue plus élevée dans les limites assignées. On pourra déjà observer ce trouble vers la 12e heure, généralement entre la 15e et la 20e heure, mais seulement vers la 30e heure si la pollution est réduite à des traces : circonstance qui ne se présentera que rarement, sans doute, mais que l'on peut réaliser par l'expérience.

1. Par parties égales de viande de bœuf et d'eau.

Dès que le trouble est bien évident, on ensemence le liquide A à l'aide d'un fil de platine flambé et recourbé en boucle, d'une part dans un tube de bouillon normal qui pourrait déjà donner une culture pure de l'un des organismes que l'on recherche, et d'autre part sur un nouveau liquide stérilisé, renfermant comme le 1er un gramme d'acide phénique, 5 grammes de peptone, et 100cc de bouillon normal par litre, et réparti dans des tubes à essai.

J'ensemence deux de ces tubes, et les expose pendant 6 heures à la température moyenne de 34°. A ce moment, que leur contenu soit trouble ou limpide, on l'ensemence par le même moyen que précédemment dans deux autres tubes où les organismes subissent leur 3e passage en liquide phéniqué dans les mêmes conditions de température. On attend cette fois que le trouble se produise : l'ensemencement de ce dernier liquide sur bouillon normal donne, après quelques heures d'étuve, une culture pure du *Bacterium coli commune*, du bacille d'Eberth, ou un mélange des deux espèces, comme on peut le vérifier par culture sur plaque de gélatine.

Je me suis assuré que les deux microbes supporteraient encore deux nouveaux passages sur liquide phéniqué, espacés de 6 heures, comme il en est pour le 2e et le 3e passages ; on pourrait donc pratiquer ces passages nouveaux en vue de séparer quelques espèces étrangères ayant résisté au traitement; je n'en ai pas rencontré dans les eaux alimentaires d'Alger.

L'application de cette technique à l'examen d'échantillons d'eaux polluées naturellement ou artificiellement a montré que les 10 vases remplis du liquide A se troublent tous en général, et l'observation de leur culture montre partout le même organisme. Il suffirait donc le plus souvent de préparer et de traiter 100cc de liquide A, correspondant à 83cc d'eau suspecte, sauf à répéter l'expérience sur un litre en cas de résultat négatif, et si l'examen de la canalisation, les recherches chimiques, ou toute autre circonstance faisaient soupçonner une pollution.

J'ai réalisé ce cas d'une eau ne renfermant que des germes très rares, en diluant au millième un échantillon ensemencé avec une culture mixte de *Bacterium coli commune* et de bacille typhique, et qui, pour un centimètre cube, donnait sept colonies pouvant se rapporter à ces deux espèces. L'eau diluée renfermait donc

environ sept germes par litre. Sur les dix matras contenant le liquide A, deux se sont troublés vers la 30e heure, trois autres avant la 36e heure, les cinq derniers restaient limpides.

Les espèces qui résistent au 1er passage en terrain phéniqué sont celles qui ont été signalées par M. Vincent. Comme cet observateur, j'ai vu le microbe d'Eberth affecter la forme en diplocoque mobile, forme passagère, due à l'action du milieu phéniqué ; mais il récupère ses attributs morphologiques habituels par un ensemencement ou une série de 3 ensemencements sur le bouillon normal.

Le *Bacterium coli commune* trouble le liquide, le plus souvent, avant le *Bacille typhique*, de sorte que si les deux espèces se trouvaient dans le même milieu, on pourrait craindre *a priori* que le premier se présentât seul après le 3e passage. L'expérience directe n'a pas justifié cette crainte : la méthode des plaques a montré que les deux microbes vivaient côte à côte dans le bouillon normal, après le premier et après le troisième passage en terrain phéniqué.

En possession de ce procédé, j'ai fait sur les eaux d'Alger les expériences suivantes :

4 *octobre* 1890. — L'eau de l'Oued-M'kacel, prise au laboratoire de chimie de l'hôpital du Dey, est transformée en liquide A. Un litre de ce liquide, divisé en dix fioles stérilisées, est exposé à la température moyenne de 34° ; il s'est troublé dans 3 récipients après la 12e heure, et dans tous les autres vers la 15e heure.

5 *octobre* 1890. — L'eau de Birtraria, prise au point B^1, et l'eau de l'Aïn-Z'boudja, prise en Z_1, Z_2, Z_3 et à la Rampe Rovigo, sont traitées comme ci-dessus, chaque échantillon fournissant 200cc de liquide A répartis en deux fioles. Le liquide est partout limpide à la 12e heure, et trouble vers la 15e heure dans tous les récipients.

6 *octobre* 1890. — Je procède de même pour l'eau du Hamma recueillie à la source, avec laquelle je prépare un litre de liquide A, réparti entre dix fioles ; et aussi pour la même eau prise en H^2, H^3, au milieu de la ville, ainsi que dans la rue de Tanger (Hamma ? Télemly ?) ; je traite de même l'eau de Télemly prise

en T^1 et T^2, chacun de ces six échantillons fournissant 100cc de liquide A. Entre la 15e et la 18e heure, le contenu des six flacons s'est troublé; le liquide est encore limpide au 4e jour dans les 10 autres vases, qui renferment l'eau du Hamma puisée à la source et traitée par la même méthode.

9 *octobre* 1890. — J'ai recueilli l'eau du Hamma à la source même et au point H^3. Les deux échantillons ont été d'une part transformés en liquide A, d'autre part additionnés d'une quantité égale de peptone à 5/1000, et de bouillon normal à 10 0/0, mais sans addition d'acide phénique. Les 4 flacons étant exposés à la température moyenne de 34°, le contenu de l'un d'eux est seul limpide après 18 heures : c'est le liquide A provenant de l'eau puisée à la source.

J'ai alors ajouté aux deux flacons dont le contenu n'est pas phéniqué. la proportion d'acide phénique nécessaire pour transformer ce contenu en liquide A.

Après 18 nouvelles heures d'étuve, l'un des flacons troubles est redevenu limpide et présente un abondant dépôt d'organismes : c'est celui qui renferme l'eau puisée à la source. Le trouble qu'on y remarquait tout d'abord est donc dû à d'autres espèces que le *Bacterium coli commune* et le bacille typhique. Au contraire, le contenu des deux autres flacons remplis au point H^3 est trouble, bien que dans l'un d'eux se soit formé un sédiment considérable d'organismes ; c'est qu'ils renferment au moins une espèce suspecte.

La limpidité des deux premiers persiste encore au 4e jour, ainsi que le trouble des deux autres.

13 *octobre* 1890. — Enfin les douze échantillons pris sur la canalisation, dont il a été question dans les expériences précédentes sont transformés en liquide A et mis ensemble à l'étuve : ils se troublent de la 14e à la 20e heure. Sitôt que le contenu d'un récipient est troublé, on l'ensemence à l'anse de platine sur un liquide phéniqué, où l'organisme qui a produit ce trouble subit, d'après les prescriptions de la méthode, deux passages espacés de six heures. Le liquide provenant du dernier passage est ensemencé sur bouillon normal.

On a ainsi obtenu douze cultures sur bouillon, à l'aide desquelles on a fait les réactions sur gélatine en piqûre et en

plaque, et sur pomme de terre. Or, l'étude des réactions sur ces divers terrains, ainsi que l'observation au microscope des caractères morphologiques de l'organisme, m'a permis de diagnostiquer le *Bacterium coli commune*, reconnaissable à tous ses caractères lorsque je l'ai comparé au *Bacterium coli* retiré de mon intestin.

Sur trois plaques, à côté des colonies appartenant au bacille du colon, se sont développées plus lentement des colonies d'un autre aspect, minces et transparentes, nacrées, bleutées, ne présentant au centre qu'une très faible élévation. On les a recueillies, ensemencées sur bouillon, et de là sur les autres terrains. Le bouillon, avant 24 heures, a présenté un trouble qui s'est peu accentué ; il ne s'est formé, après plusieurs jours, qu'un faible dépôt. Les cultures sur gélatine ne dégagent aucune odeur, et ne sont jamais liquéfiées ; sur plaque, les colonies apparaissent au 3e jour et présentent les caractères indiqués ci-dessus. L'ensemencement sur pomme de terre a provoqué la formation d'une culture visible au 2e jour ; elle ne présente aucune épaisseur, est incolore, humide et brillante, glacée. Le microscope montre dans le bouillon et dans cette culture sur pomme de terre un bacille présentant des dimensions inégales, très mobile dans le bouillon ; les individus de première grandeur, très rares, animés d'un mouvement sinueux ; les autres plus nombreux et plus petits, d'un mouvement oscillatoire très vif et d'un mouvement de translation rapide qui leur fait traverser tout le champ ; ce bacille est décoloré par la méthode de Gram.

Ce sont bien les attributs du bacille typhique tels que je les ai observés sur deux échantillons d'origine authentique cultivés parallèlement, tels aussi qu'ils lui sont assignés par les observateurs, et qui suffisent, pour assurer son diagnostic, à qui en a fait une étude patiente.

Les plaques d'où on a pu isoler le bacille typhique proviennent de l'eau de l'Aïn Z'Boudja (réservoir de la Synagogue et Rampe Rovigo) et de l'eau de la Birtraria prise en B[1].

CONCLUSIONS

Il résulte des considérations développées en premier lieu que parmi les eaux de sources étudiées, celles du Hamma et du

Télemly sont seules des eaux de profondeur, et que sur tous les points, la canalisation, vicieuse par sa nature même, présente encore des défectuosités qui montrent comme possible et probable une pollution par les matières excrémentitielles.

Les expériences chimiques indiquées ensuite ont fourni des résultats qui permettent d'assurer l'existence d'infiltrations du dehors dans l'intérieur de la canalisation.

Enfin, les recherches microbiques entreprises par le procédé que j'ai décrit ont permis d'isoler de toutes ces eaux le *Bacterium coli commune*, hôte habituel des matières fécales et des eaux polluées.

L'ensemble de ces notions démontre d'une manière évidente que les eaux de sources d'Alger sont entachées de pollution par les matières fécales.

Enfin, on a pu isoler des eaux de la Birtraria et de l'Aïn-Z'Boudja le bacille typhique, à la date du 13 octobre 1890; et ainsi se trouve éclairée, dans une de ses grandes lignes, l'étiologie de la fièvre typhoïde à Alger.

Quel est le degré d'intensité de cette pollution? Il ne m'a pas paru nécessaire de le rechercher. En effet, pour l'hygiéniste, une eau potable ne doit renfermer aucun germe nocif ou suspect; par contre l'eau est polluée quand elle renferme ces germes, si minime qu'en soit le nombre, et toute pollution, faible ou forte, entraîne condamnation. Suivant cette doctrine, les eaux d'Alger doivent être condamnées.

Je me fais un devoir de remercier ici nos collègues et amis, MM. Cuminet et Bodard, pour l'empressement qu'ils ont mis à m'offrir et à me prêter leur précieux concours.

RECHERCHES SUR LES ORGANISMES DE LA NITRIFICATION

(4e MÉMOIRE).

PAR M. S. WINOGRADSKY.

SUR UN MILIEU SOLIDE APPROPRIÉ A LEUR CULTURE.

En décrivant, dans mon premier mémoire sur la nitrification, la voie par laquelle je suis parvenu à découvrir un organisme nitrificateur, j'ai insisté sur les difficultés qu'on rencontre, quand on veut le cultiver à l'état de parfaite pureté. La culture dans une solution de sels inorganiques ne lui assure qu'une très grande prépondérance, mais n'exclut pas les quelques autres formes de bactéries banales, dont les germes, quelque nombreux que soient les ensemencements successifs, passent avec lui de culture en culture, et atteignent à chaque fois un certain degré de développement. Pour m'en débarrasser, j'ai utilisé, comme se rappellent les lecteurs des *Annales*, la manière différente dont se comportent sur la gélatine nutritive ces formes étrangères d'un côté, les *nitrobactéries*[1] d'un autre. Ces dernières n'y poussent pas, tandis que les premières révèlent tout de suite leur présence par la formation de colonies. En étalant sur la gélatine le dépôt magnésique ou calcique des cultures (contenant surtout l'organisme cherché), je le reprenais au bout d'un temps suffisant aux endroits libres de toutes colonies, et je l'utilisais comme semence; de cette manière j'ai réussi une première fois à avoir des cultures nitrifiées, exemptes de tout germe se développant sur la gélatine au bouillon peptonisé.

1. C'est ainsi que nous désignerons le petit groupe d'organismes, dont l'oxydation de l'azote ammoniacal est la fonction. M'étant assuré que, pris dans des localités éloignées, ils présentent des différences morphologiques assez marquées, je préfère en parler non comme *d'un ferment unique*, mais comme d'un *groupe physiologique*.

J'ai signalé ce résultat, en m'abstenant de recommander la méthode comme étant toujours d'une application sûre. Elle devait encore faire ses preuves.

Depuis, j'ai eu maintes fois l'occasion d'entreprendre la séparation des nitrobactéries de diverses terres, et j'ai été amené par des échecs à reconnaître que cette méthode ne suffit pas dans la majorité des cas. En voici la raison. Il est très facile d'éliminer par ce procédé tous les organismes qui croissent rapidement sur la gélatine, et dont les colonies se montrent au 2e ou 3e jour. J'y ai réussi presque toujours d'un coup. Mais il n'en est pas ainsi avec d'autres espèces à végétation pénible sur le même milieu, et qui sont souvent présentes dans le sol ; j'ai eu l'occasion de m'en assurer. Leurs colonies n'apparaissent que du 8e au 10e jour, et elles restent longtemps très petites. Il arrive ainsi, par exemple, qu'on pique la gélatine à un endroit complètement exempt de colonies, et qu'en examinant ensuite la piqûre et ses alentours on les trouve remplis de très petites colonies. Il n'est guère douteux alors que la semence puisée n'a pas été pure. On n'a aucune chance de remédier à cet inconvénient, en reculant le moment de la prise de semence, car au bout de dix jours environ la surface de la gélatine n'en fournit plus d'efficace. En somme, il faut le concours d'un heureux hasard, j'entends l'absence de ces microbes à végétation lente, pour réussir à isoler complètement une nitrobactérie par ce procédé. Il permet pourtant de pousser très loin, en peu de temps, la purification d'une culture impure.

Par malheur, il y a encore à compter, dans cette question de la séparation des nitrobactéries, avec une difficulté autrement sérieuse. Quelles garanties de la pureté d'une culture de ces organismes faut-il exiger ? Autrefois on considérait un liquide comme stérile, s'il ne donnait pas de végétation sur la gélatine : l'ensemencement sur ce milieu était tenu pour le mode de contrôle le plus décisif. Il a été démontré maintenant qu'un liquide peut contenir des quantités énormes de nitrobactéries et laisser les gélatines stériles. Mais pour les autres qui l'accompagnent comme impuretés, on était autorisé, d'après les opinions courantes, à considérer toujours l'épreuve de la gélatine comme valable. Le phénomène de nitrification et la stérilité sur la gélatine nutritive sont devenus ainsi tout naturellement les caractères d'une culture pure de nitrobactéries. Indépendamment

l'un de l'autre, M. et Mme Frankland [1] et moi, nous les avons adoptés.

Pour ma part, j'avoue pourtant ne les avoir avancés que provisoirement, et sans être convaincu de leur infaillibilité. Strictement parlant, l'épreuve de l'ensemencement sur la gélatine ne suffit pas à elle seule, car refuser d'y croître n'est pas un privilège exclusif des nitrobactéries. Tel peut être le cas quelquefois, pour un mélange accidentel de microbes introduits avec une terre quelconque dans les cultures, mais le critérium n'est pas absolu [2]. Il se peut ainsi qu'en croyant avoir réussi, on ne parvienne qu'à éliminer tout ce qui croît sur la gélatine, sans débarrasser les cultures de quelques espèces étrangères, réfractaires, comme les nitrobactéries, à ce genre de culture, mais qui auraient réapparu si elles avaient été ensemencées dans le bouillon ou quelque autre liquide nutritif [3].

Pour décider de la pureté ou non pureté, une étude microscopique soigneuse avec l'emploi de diverses méthodes de coloration peut certainement venir en aide. Avec une connaissance parfaite des formes de la nitrobactérie qu'on cherche à isoler, et en laissant de côté toutes les idées de variation, on ne reconnaîtra comme pure qu'une culture dont l'homogénéité est absolue, mais non sans réserve encore, car les germes étrangers, s'il n'y en a que très peu, échappent facilement, comme on le sait, à l'analyse microscopique la plus consciencieuse.

On pourrait bien ne pas pousser plus loin et se désintéresser de ces quelques germes, dont l'influence sur la nitrification est bien sûrement nulle, s'il ne s'agissait que de ce phénomène. Il faudrait renoncer alors à l'étude de plusieurs autres questions : pour n'en citer qu'une, à celle de l'action des nitrobactéries sur les corps azotés autres que les sels ammoniacaux. Je n'ai pas besoin d'insister pour montrer qu'il ne serait guère raisonnable de l'entreprendre sans avoir toute garantie de la pureté absolue des cultures.

1. Le phénomène de nitrification et son ferment spécifique. *Philos. Transactions of the R. Soc. of London*, vol. 181 (1890).

2. J'ai vu bien d'autres microbes, comme ceux, par exemple, des sources sulfureuses et ferrugineuses, pour lesquelles ce milieu est non seulement défavorable, mais même mortel.

3. C'est là, peut-être, qu'il faut chercher l'explication de quelques observations de M. et Mme Frankland, exposées dans l'annexe de leur mémoire cité.

Il existe encore une méthode générale pour la séparation des microbes qui s'imposait dans ce cas, où la gélatine refusait le service. C'est la méthode dite de dilution. Aussi n'a-t-on pas manqué de l'essayer. C'est M. Percy Frankland et Mme Frankland [1] qui s'en sont servi avec le plus de persévérance et le plus de résultat. Leurs *expériences de dilution* ont demandé deux ans, et ce n'est qu'au bout de ce temps qu'une seule culture de leurs longues séries s'est montrée comme « pure », c'est-à-dire qu'elle nitrifiait, laissait la gélatine au bouillon-peptone stérile, et, je le suppose, se montrait au microscope comme sensiblement homogène.

M. Warington [2] a aussi employé cette méthode sans pouvoir épurer ses cultures à ce point. Moi, je l'ai essayée pendant l'hiver de 1889-90. J'ai fait trois séries d'expériences (en tout 50 ensemencements) qui ont complètement manqué leur but. Ou il n'y avait aucune nitrification, ou les cultures nitrifiaient, mais leur impureté n'était rien moins que douteuse. J'ai bientôt définitivement abandonné la méthode, comme ne valant rien dans ce cas, et je persiste dans mon opinion. Elle prend énormément de temps et le hasard, qui y est tout, n'aide que trop mal nos efforts. Rendant tout hommage à la patience des auteurs cités, je ne crois pas que leur exemple inspire à quelqu'un, qui voudrait isoler le ferment nitrique de quelque terre, le désir de le faire par *dilution* [3].

On comprendra, après ce qui a été dit, que la nécessité de chercher une méthode plus sûre s'imposait. Recourir aux milieux gélatinisants, et en chercher un qui soit apte à nourrir ces organismes, était évidemment le chemin qui promettait le plus. Ce milieu trouvé et ceux-ci y formant des colonies facilement reconnaissables, le problème aurait fait un grand pas vers sa solution, à une condition pourtant de plus, c'est que ce milieu soit en même temps absolument défavorable aux autres microbes; autrement, à cause de la lenteur extraordinaire de l'accroissement des nitrobactéries, il serait, dans la plupart des cas, envahi et altéré avant que celles-ci eussent le temps d'atteindre un certain degré de développement.

1. *Loc. cit.*
2. *Chem. News*, vol. LXI, n° 1562.
3. L'histoire morphologique de ces organismes nous expliquera pourquoi cette méthode aussi refuse le service.

J'avais déjà essayé antérieurement, comme milieux de cultures, des solutions salines gélatinisées par la gélatine ou la gélose. Je renouvelai ces essais. Ayant maintenant plus d'expérience dans la culture des nitrobactéries, j'espérais pouvoir mieux aboutir. La solution suivante fut gélatinisée par 10 °/₀ de gélatine ou par 1 °/₀ de gélose :

Phosphate de potasse	0. 1
Sulfate de magnésie	0. 05
Chlorure de calcium	trace
Carbonate de soude	0. 5
Eau distillée	100

La gelée étant prête et stérilisée, on y incorporait quelques centimètres cubes d'une solution contenant :

Sulfate d'ammoniaque	0. 2

Je savais que cette solution était favorable aux nitroorganismes. En la gélatinisant, surtout par 1 °/₀ de gélose, on pouvait supposer qu'elle resterait telle pour eux, sans devenir sensiblement nutritive pour d'autres.

Les expériences de culture sur ces deux milieux n'eurent aucun résultat. J'ai dû bientôt définitivement rejeter l'usage de la gélatine : ensemencées par une goutte d'une culture nitrifiée impure, les plaques se liquéfiaient très rapidement, plus rapidement même que la gélatine au bouillon-peptone ayant reçu la même semence [1].

L'ensemencement de la gélose s'effectuait en étendant une goutte du liquide sur toute la surface de la plaque, ou en stries. Les végétations apparaissaient bientôt comme des taches diffuses, mal circonscrites, et envahissaient au bout de dix jours toute la surface de la plaque, rendant impossible l'opération d'isolement de la nitrobactérie, si même elle avait poussé. Mais je n'y ai jamais rien trouvé de ressemblant aux deux nitrobactéries que je cherchais à isoler par ce moyen, de même que je n'ai jamais réussi à constater dans ce milieu la présence de nitrites ou de nitrates. Quelques expériences ont pourtant duré 18 jours. Tout cela n'encourageait pas à continuer ces essais.

1. Sur cette dernière je ne voyais les liquéfactions apparaître qu'au 3e jour autour de grandes colonies assez rares, tandis que sur l'autre elle commençait, après 24 heures déjà, au voisinage de toutes petites colonies.

Je me trouvai donc conduit une fois de plus, dans mes recherches sur la nitrification, à éviter d'une manière absolue toute substance organique. Renonçant à regret aux substances gélatinisantes animales et végétales, dont l'emploi est si commode, j'eus recours à une substance gélatinisante d'origine minérale. Le choix n'en est pas grand : entre l'hydrate d'alumine et celui de silice, je choisis le dernier.

On connaît la préparation de la solution aqueuse d'acide silicique, d'après la méthode de Graham [1], capable de se gélatiniser très facilement sous l'action de toute sorte de substances, et que M. W. Kuhne a proposée [2] pour faire des terrains de culture. En l'additionnant en certaines proportions d'une solution de sels minéraux, je me composais une gelée où toutes les nitrobactéries que je cultive ne tardèrent pas à se développer.

Voici quelques détails sur la préparation et la composition de cette gélatine minérale. — milieu qui répond à toutes les exigences que nous avons posées plus haut.

Le verre soluble qu'on trouve en vente est généralement d'une consistance épaisse, presque sirupeuse ; on l'étend alors de trois fois son volume d'eau. Cent centimètres cubes de ce liquide sont versés en agitant dans 50^{cc} d'acide chlorhydrique étendu, et le mélange mis dans un dialyseur quelconque [3].

Au bout de trois jours, en laissant le dialyseur le premier jour dans l'eau courante, le reste du temps dans l'eau distillée, souvent renouvelée, la solution est prête pour l'usage. On le reconnaît à ce qu'elle ne donne aucun trouble avec le nitrate d'argent. Elle peut alors être stérilisée par ébullition et conservée dans un ballon bouché avec du coton ou du liège.

Quant à la solution de sels minéraux à faire gélatiniser, je l'emploie de préférence ainsi dosée :

Sulfate d'ammoniaque	0. 4
Sulfate de magnésie	0. 05
Phosphate de potasse	0. 1
Chlorure de calcium	trace
Carbonate de sodium	0. 6 à 0. 9
Eau distillée	100

1. Graham-Otto, *Lehrbuch d. Chemie*, t. II, p. 963, 1881.
2. L'acide silicique comme milieu nutritif pour les organismes. *Zeitschr. f. Biol.*, t. IX, p. 173.
3. Il est inutile d'employer une solution dosée de silicate. Tout ce qu'il faut c'est de soumettre à la dialyse un liquide avec excès d'acide, et suffisamment dilué pour ne pas s'exposer au désagrément de le voir se gélatiniser spontanément dans le dialyseur.

Les sulfates avec le chlorure d'un côté, le phosphate et carbonate d'un autre sont dissous séparément et les deux solutions stérilisées à part ; on les mélange après refroidissement.

Pour les cultures, je me servais des boîtes en verre bien connues que je choisissais petites (5 c. de diamètre) et de verre mince. L'arrangement des cultures se fait comme il suit :

On commence par concentrer la solution silicique en l'évaporant dans un petit ballon, jusqu'à ce qu'elle soit réduite à la moitié de son volume. Avant que le liquide ait atteint ce degré de concentration, on ralentit l'évaporation et on fait quelques essais successifs de son pouvoir gélatinisant. Pour cela, on prend sur un verre de montre 2 ou 3 gouttes du liquide et on y ajoute une goutte de solution saline : la tendance à gélatiniser doit se manifester au bout de 5 minutes ; au bout de 10 à 15, la gelée doit être si plastique qu'une empreinte faite sur sa surface ne s'efface plus. Aussitôt ce degré atteint, il n'est pas bon de pousser la concentration plus loin, car alors la gelée ne sera pas pure, mais remplie de grains et d'écailles d'acide silicique insoluble. On distribue ensuite la solution silicique au moyen d'une mince pipette dans les boîtes et on la gélatinise, en y faisant couler la solution de sel ; selon le degré de solidité qu'on veut atteindre, on en prend la moitié ou le tiers du volume de la solution silicique, et on n'oublie pas de bien mélanger les deux liquides. Au bout de quelques minutes une faible opalescence dénote la gélification.

Si on veut répartir la semence dans la plaque, on a le temps de le faire immédiatement après avoir mélangé les deux liquides. Pour ensemencer par stries, on attend que la coagulation soit complète, soit quinze minutes.

Quelquefois je remplaçais, dans ma solution de sels, le carbonate alcalin, dont l'emploi présente quelque inconvénient, par le carbonate de magnésie. La limpidité de la gelée est alors naturellement perdue et sa transparence diminuée. mais cela ne gêne que peu l'observation ; c'est qu'autour des colonies vigoureuses les grumeaux du sel sont dissous, et elles apparaissent alors entourées d'une zone limpide. Loin de cacher les colonies, la présence du carbonate insoluble attire l'attention sur elles et rend visible leur action caractéristiqne.

Quant aux végétations que forment les nitrorganismes sur

ce milieu, il ne faut pas, je le dis tout de suite, se les figurer d'après ce qu'on voit généralement sur les plaques ordinaires, ensemencées par quelque microbe banal. Une nitrobactérie n'est pas du tout capable de l'énergie de croissance connue pour la plupart des microbes. Les colonies englobées dans la gélatine restent toujours petites ; les plus grandes d'entre elles ne sont que visibles à l'œil nu, comme des points blancs. Le long des stries, par contre, il se forme une croûte blanche assez épaisse. Pour l'œil non armé il n'y a, en somme, rien de très caractéristique, si ce n'est le fait même de la formation de colonies sur un milieu de cette nature. Mais cette impression change du tout au tout quand on examine les plaques à un faible grossissement : les colonies de l'intérieur, celles de la surface surtout, revêtent alors un aspect si curieux qu'après les avoir vues même une seule fois, on les reconnaîtra du premier coup d'œil.

Cette gélatine minérale est de plus, comme nous l'avons exigé plus haut, très défavorable à la végétation des microbes autres que les nitrobactéries, et ne s'altère que sous l'action de ces dernières. En préservant soigneusement les plaques de la dessiccation, on peut y entretenir la culture de ces organismes pendant des semaines. J'ai quelques-unes de ces cultures qui durent déjà depuis six semaines, et quoiqu'on n'y remarque plus d'accroissement, les colonies ainsi que la gelée sont encore en bon état.

Cependant l'espérance que ce milieu ne permettrait le développement d'aucun organisme étranger a été déçue. Ceux qui accompagnent les nitrobactéries dans l'eau distillée additionnée de sels minéraux poussent également sur la gelée silicique, mais ils n'y forment pas de colonies proprement dites, leurs végétations étant plus que pauvres. Ils font généralement leur apparition avant la nitrobactérie, et s'étendent exclusivement sur la surface en formes de taches blanchâtres, si transparentes, que sans les chercher on ne les apercevrait pas. Ayant atteint bientôt une certaine grandeur, ces taches ne changent plus pendant des semaines entières. Cette circonstance rend les opérations d'isolement plus délicates, mais ne les empêche pas. Elles seront décrites en détail dans un prochain mémoire.

A tout prendre, je considère ce procédé de culture comme une ressource importante dans l'étude des organismes de la

nitrification. Il n'y a plus désormais de difficulté à les découvrir et à les caractériser parmi les innombrables espèces microbiennes du sol. Les longues séries de cultures successives, destinées à les purifier, ne sont plus nécessaires. En introduisant directement un peu de terre dans la gelée silicique, on pourra tout de suite trouver le microbe actif. Il est préférable, cependant, de provoquer préalablement la nitrification dans une solution aqueuse par une trace de terre, pour, de là, faire le premier ensemencement sur le milieu solide. Dans ce cas toutes les colonies, qui y apparaissent, sont absolument uniformes, il n'y a ni à choisir, ni à douter. Veut-on avoir tout de suite la preuve qu'elles nitrifient, il n'y a qu'à prélever sur la plaque un petit morceau de gelée, gros comme un grain d'orge, et le jeter dans un peu d'acide sulfurique additionné de diphénylamine; la tache qui s'y forme au moment même du contact, est d'un bleu égalant par son intensité une solution saturée de bleu d'aniline.

Ce genre de culture m'a rendu de très bons services pour l'étude morphologique des organismes en question. Il m'a permis d'approfondir ce sujet, de suivre sans lacune le développement de quelques-uns d'entre eux, et de rendre leur caractéristique morphologique aussi complète qu'on peut le désirer. Ces observations feront l'objet d'un mémoire en préparation.

SUR UNE ACTION DIRECTRICE

QU'EXERCENT CERTAINS CORPS

SUR LES TUBES SPORANGIFÈRES DE « PHYCOMYCES NITENS »

PAR M. F. ELFVING

On sait que les tubes sporangifères de la mucorinée *Phycomyces nitens* se prêtent singulièrement aux recherches sur l'irritabilité du protoplasma végétal. Sous l'influence de la lumière et de la pesanteur, ils affectent des directions déterminées, qu'ils cherchent à reprendre, si l'on les en a écartés, par des courbures assez promptes, dues à une croissance inéquilatérale de l'organe. Grâce à la sensibilité extrême de ses tubes, je suis parvenu à découvrir une action physiologique de quelques corps à distance.

Si l'on dispose au-dessus d'une culture vigoureuse de *Phycomyces*, telle qu'on l'obtient en semant quelques spores sur du pain humecté, une plaque de fer en position verticale (fig. 1), et qu'on place le tout dans l'obscurité à une température de 15-20°, on trouvera au bout de quelques heures que les tubes jeunes, au lieu de pousser verticalement, comme ils le font ailleurs, se sont courbés de tous côtés vers le fer. Cette attraction du métal se manifeste à une distance de quelques centimètres. Arrivés au contact avec la plaque, les tubes se courbent irrégulièrement, comme après avoir heurté contre un solide quelconque.

Également actifs sont le fer de fonte, le fer battu et l'acier.

La nature de la surface du métal est sans importance ; au moins l'attraction est manifeste avec du fer poli, limé, ou un peu rouillé.

Parmi les autres métaux, je n'ai trouvé que le zinc et l'aluminium qui montrent le même effet, quoiqu'à un degré infiniment plus faible, souvent incertain. Inactifs sont platine, argent, or, cuivre (fig. 2), plomb, cadmium, étain, antimoine, bismuth, cobalt, nickel ; inactif est aussi le laiton.

Le magnétisme ne joue aucun rôle dans ce phénomène, car un bâton de nickel, assez fortement magnétique, était sans action, tandis qu'un bâton de fer de même dimension, qui n'était pas sensiblement magnétique, provoquait des courbures très nettes.

Il ne peut non plus s'agir ici d'un effet des rayons lumineux ou calorifiques, le phénomène s'accomplissant avec des pièces

de fer restées un an à l'obscurité et à la température ordinaire.

On ne peut pas invoquer l'électricité comme cause de ces courbures, le fer occupant une place peu caractéristique dans la série électrique ; du reste, une plaque de fer en communication avec la terre reste active.

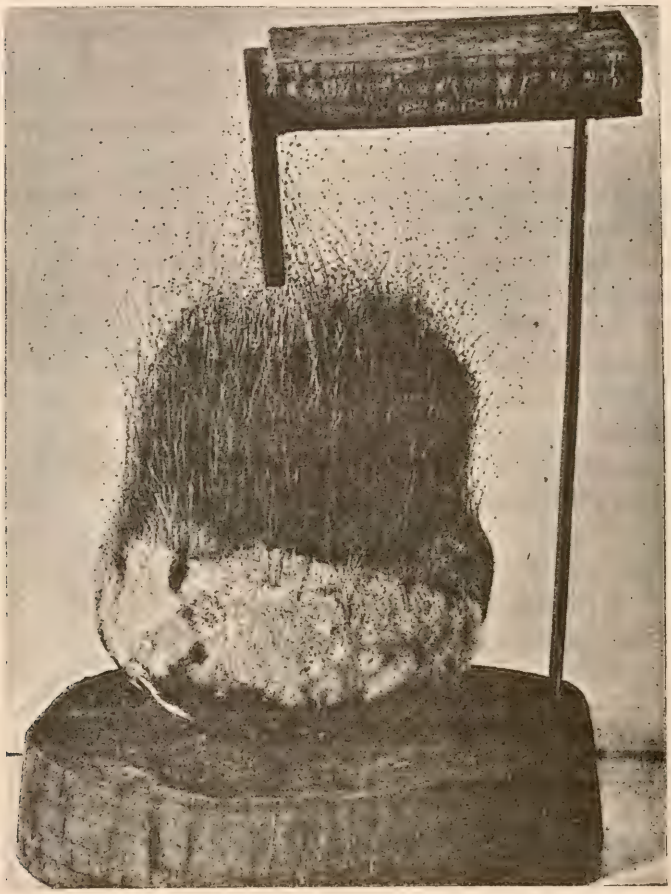


Fig. 1. — Plaque de fer.

Il s'agit ici évidemment d'une action spéciale du fer (zinc, aluminium). Je dois ajouter que je n'ai pas retrouvé cette propriété du fer dans ses combinaisons telles que la magnétite, l'hématite et le ferrocyanure de potassium.

Il y a un certain nombre de corps, outre le fer, qui provoquent

chez les tubes de *Phycomyces* des courbures analogues. Tels sont la cire à cacheter, la colophane, le papier lisse, la cire, la soie, le coton, l'os, la laine, le linge, le caoutchouc, le bois, le soufre, etc. Comme corps inactif ou doué, dans quelques échantillons, d'une action très faible, il faut citer le verre.

Fig. 2. — Plaque de cuivre.

Quand on emploie des corps qui attirent de l'humidité, il faut qu'ils soient bien secs pour que le phénomène se manifeste bien nettement, les tubes de *Phycomyces* fuyant, comme on le sait, les surfaces humides. Humecte-t-on, par exemple, légèrement l'un des côtés d'un carton, on trouvera celui-ci sans action tandis que l'autre est encore actif; il suffit de dessécher complè-

tement le carton pour faire reparaître son activité. De même, en employant du papier à écrire, on n'obtient pas d'action en opérant dans une atmosphère très humide.

Avec la cire à cacheter, qui n'est pas hygroscopique, l'expérience réussit aussi dans une atmosphère saturée d'humidité. Cependant, par un séjour prolongé (15 jours), dans un tel milieu, le corps perd la propriété en question. Il suffit, pour la faire reparaître, de le frotter fortement. On pourrait supposer que le phénomène est dû à une faible tension électrique, faisant naître dans l'intérieur des cellules des changements d'où résulte la flexion. Mais comme l'électroscope à feuille d'or n'a très souvent pas assigné d'électricité chez des corps nettement actifs; comme la cire à cacheter est restée active après 4 jours passés dans une atmosphère très humide; comme enfin je n'ai jamais réussi à rendre actifs des corps inactifs, comme le verre et le laiton, en les électrisant de manières différentes, il faut, jusqu'à preuve contraire, admettre qu'il s'agit ici d'une propriété spéciale de structure interne des corps mentionnés.

Parmi les corps actifs, il faut encore citer des êtres vivants, tels que les racines vigoureuses des pois, des haricots, des lupins, des ricins en germination, ainsi que l'hypocotyle des haricots; la région en croissance de ces organes attire faiblement les tubes de *Phycomyces*.

Enfin, ces tubes exercent eux-mêmes sur leurs voisins une influence de même nature, quoique dans un sens opposé; il y a entre eux une répulsion faible. Pour la rendre manifeste, il faut éliminer l'influence directrice de la pesanteur et de la lumière, en faisant tourner lentement, autour d'un axe horizontal et à l'obscurité, une culture de *Phycomyces*. Les tubes qui occupent les bords de la culture se courbent bientôt en dehors, souvent sous un angle presque droit, tandis que ceux du centre, entourés de tous côtés, continuent à pousser en ligne droite.

On serait tenté de croire que ceux-là fuient les produits de respiration de leurs voisins et cherchent de l'air, mais le phénomène s'observe aussi quand on fait passer au travers d'une culture, disposée comme on vient de dire, un courant d'air assez fort pour enlever ces produits; du reste, *Phycomyces* n'éprouve pas la moindre influence, quant à sa direction, de l'acide carbonique s'écoulant par un tube étroit placé au-dessus d'une culture.

RECHERCHES SUR LES NODOSITÉS RADICALES

DES LÉGUMINEUSES [1]

PAR M. EM. LAURENT.

Travail fait au laboratoire de chimie biologique de la Sorbonne
à l'Institut Pasteur.

Bien peu de questions de physiologie végétale ont été l'objet d'autant de controverses que celle de l'origine de l'azote des Légumineuses. Depuis deux mille ans, ces plantes sont considérées, à bon droit, par les agriculteurs, comme *améliorantes*, c'est-à-dire, qu'elles semblent rendre le sol plus fertile lorsqu'elles l'ont occupé pendant un certain temps. Cette propriété, qui implique l'assimilation par ces plantes de l'azote libre de l'atmosphère, a paru longtemps paradoxale aux chimistes et aux physiologistes. Elle n'a commencé à entrer dans la science que lorsque M. Hellriegel fit voir que *la végétation des Légumineuses, dans les sols privés d'azote, ne peut réussir complètement que si leurs racines sont pourvues de petits tubercules particuliers.*

Mais que sont ces tubercules, et à quelle cause sont-ils dus? On les connaît depuis longtemps, et les botanistes du XVIIe siècle les mentionnent; on les a pris tantôt pour des productions physiologiques, tantôt comme le résultat de l'intervention des microbes [2]. Quelques détails sur leur structure ne seront pas inutiles pour bien comprendre leur genèse et leur étiologie.

1. Les points principaux exposés dans ce travail ont été présentés dans une note préliminaire à l'Académie des Sciences de Paris, à la séance du 17 novembre 1890.

2. Sous le nom de microbes, je comprends l'ensemble des organismes inférieurs.

I

LES NODOSITÉS.

Les nodosités radicales ont été observées sur la plupart des Légumineuses, et sont si régulièrement présentes en particulier chez les Papilionacées, que certains botanistes les ont considérées comme un caractère de famille. Très communes dans les genres Trèfle, Pois, Fève, Lupin, elles sont beaucoup plus rares chez les Genêts, les Astragales, et surtout la Pistache de terre (*Arachis hypogæa*). Elles ne sont du reste pas toujours également abondantes dans la même espèce : certains sols, en général les moins fertiles, sont plus favorables que d'autres à l'apparition des tubercules.

Des formations analogues, souvent plus volumineuses, se rencontrent sur les racines des Aulnes et des *Elæagnus*. En dehors de ces deux genres, on ne connaît de nodosités radicales, comparables à celles des Légumineuses, sur aucun autre végétal à l'état normal.

La forme de ces tubercules peut différer beaucoup dans des espèces voisines, mais elle est assez constante dans la même espèce. Tantôt les tubercules sont simples et sphériques (Haricot), ovoïdes ou elliptiques (Trèfle, Gesse), tantôt ils présentent des ramifications plus ou moins nombreuses nées à la suite de dichotomies successives (Vesce, Luzerne). Les Lupins, surtout le Lupin jaune, ne sont pas pourvus de nodosités abondantes; souvent, au voisinage du collet, il se forme une masse volumineuse, d'abord latérale, mais qui, plus tard, enveloppe toute la périphérie.

A première vue, les tubercules radicaux ne semblent pas obéir aux règles qui président à l'apparition des racines nouvelles sur les axes radicaux. Il n'en est rien cependant et, comme l'ont démontré MM. Van Tieghem et Doulliot [1], la position occupée par les nodosités se trouve en relation constante avec le système libéro-ligneux ou fibrovasculaire de la racine.

Une couche cellulaire spéciale, le péricycle ou péricambium

1. *Bull de la Soc. bot de France*, t. XXXV, p. 105, 1888.

donne naissance aux tubercules de même qu'aux radicelles des Légumineuses. Elle se trouve à la périphérie du cylindre central, et confine donc à l'assise cellulaire la plus interne du système cortical. Cette assise, appelée endoderme, et parfois aussi les assises corticales les plus internes, agrandissent et cloisonnent leurs cellules autour des endroits où des formations latérales vont se produire ; elles constituent la poche digestive, chargée de digérer le reste de l'écorce.

A l'état adulte, un tubercule présente toujours deux catégories de cellules nettement distinctes. Les unes occupent la

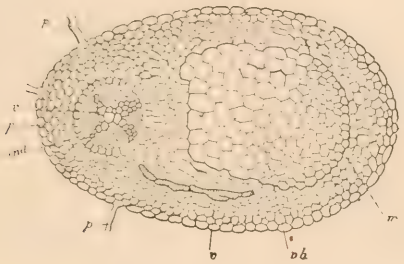


Fig. 1. Gross. 50.

p, Poils radicaux; *v*, vaisseaux; *p b*, parenchyme à bactéroïdes; *m*, meristème; *p*, péricycle; *end*, endoderme.

portion centrale; elles sont relativement très grandes, et, de prime abord, semblent remplies d'un contenu dense et fortement granuleux. Autour d'elles des couches cellulaires plus ou moins nombreuses constituent l'écorce; leurs cellules sont plus petites et hyalines. Au milieu de celles-ci, existent des cordons libéro-ligneux en relation avec un ou plusieurs faisceaux correspondants de la racine. Dans la grande majorité des cas, on découvre sur une coupe transversale un nombre variable de faisceaux libéro-ligneux disposés en cercle autour des grandes cellules centrales. Des coupes longitudinales permettent de constater que ces faisceaux partent de l'axe radical, ordinairement en un tronc unique qui se bifurque plusieurs fois, et dont les branches divergent vers la périphérie. Chaque cordon comprend, au moins sur une portion de son parcours, une région ligneuse et une région libérienne.

Lorsque la nodosité est très jeune, elle porte encore des poils radicaux; mais ils disparaissent par la suite. En même temps, elle prend une teinte brune, et ses cellules les plus externes se subérisent, au moins dans la portion parvenue à l'état adulte. Parfois aussi les tubercules deviennent rougeâtres; c'est le tissu central qui prend cette coloration.

Les cellules les plus extérieures de l'écorce sont souvent l'objet d'exfoliations partielles; leur surface prend alors un aspect assez irrégulier qui rappelle celui de certaines pilorhizes.

Reprenons l'examen du tissu à grandes cellules qui occupe la région centrale des nodosités. Il se distingue très nettement des cellules hyalines environnantes; çà et là des éléments ont conservé leur aspect ordinaire, ce qui annonce déjà que la transformation n'est pas due à une cause générale, mais est provoquée par un agent particulier localisé à certains endroits.

Un grossissement suffisant met en évidence, tout au moins dans les cellules situées vers la base de la nodosité, des éléments bactériformes extrêmement abondants. Parfois ils paraissent mobiles; mais ce n'est pas autre chose que l'effet du mouvement brownien, car les mouvements persistent dans les solutions iodées et d'autres liquides toxiques.

Des fragments de tubercule écrasés sur une lame, et examinés au microscope, permettent d'observer les aspects très variés des petits corps bactériformes, que je désignerai sous le nom de *bactéroïdes* à l'exemple de M. Brunchorst. Ils ont environ 1 μ de diamètre transversal, mais il y en a de plus gros et de plus minces. Les uns rappellent à s'y méprendre l'aspect des bacilles les plus communs, avec cette différence que leurs contours sont moins réguliers (Haricot, Cytise, Lupin). D'autres sont ramifiés et simulent soit la lettre Y ou bien la lettre T (Pois, Vesce), il y en a parmi ceux-ci qui ont des formes plus irrégulières encore par suite de ramifications dichotomiques.

Ainsi que l'ont fait remarquer M. Frank et M. Beyerinck, la forme des bactéroïdes est assez constante chez une même espèce, ou, tout au moins, il existe pour chacune une forme dominante. Cette règle n'est cependant pas absolue, et je signalerai plus loin une cause assez intéressante de variations.

Sous l'influence des réactifs, les bactéroïdes se comportent comme les bactéries banales : ils se colorent en jaune par l'iode,

absorbent avec la plus grande facilité les couleurs d'aniline, particulièrement la fuchsine et le violet de méthyle, ainsi que l'hématoxyline. Au chapitre III, j'aurai l'occasion de discuter la nature des bactéroïdes.

Ce sont ces corpuscules qui attirent le plus l'attention de ceux qui observent pour la première fois des nodosités au microscope. Il y a cependant d'autres éléments non moins intéressants dans le tissu à bactéroïdes. Les cellules qui constituent ce tissu ne sont pas semblables dans une nodosité en voie de croissance. Nous venons de voir que les plus anciennes sont bourrées de bactéroïdes; à côté de celles-là, il y en a qui sont creusées de plusieurs vacuoles ou d'une grande vacuole centrale entourée d'une couche protoplasmique relativement épaisse; on y distingue un noyau volumineux avec nucléole apparent; enfin les cellules les plus jeunes, voisines du tissu générateur ou méristème, se trouvent vers le sommet du tubercule. Ce méristème reste actif pendant un temps assez long, de sorte que sur une coupe longitudinale de nodosité, perpendiculaire à la racine mère, on distingue le plus souvent des cellules à bactéroïdes aux différents états de développement.

Une telle coupe, traitée par une solution iodée, présente la coloration bleue caractéristique de l'amidon, tout au moins dans une partie du tissu central. Au microscope, on reconnaît la présence de grains d'amidon dans la plupart des cellules à bactéroïdes, et aussi dans celles qui, arrivées à leur taille adulte, n'en contiennent pas encore. Généralement, une assise ou deux des cellules internes de l'écorce renferment également de l'amidon. Cet amidon n'est que transitoire, et un rôle important lui est réservé dans la physiologie du tubercule.

Dans les cellules les plus jeunes du parenchyme à bactéroïdes traité par l'iode, un examen microscopique très attentif permet d'observer des filaments protoplasmiques non cloisonnés, assez irréguliers, qui traversent les membranes cellulaires et se renflent çà et là en masses ovoïdes ou sphériques, sessiles ou pédicellées, isolées ou réunies par deux ou trois sur un même support. Découverts d'abord par M. Prillieux[1] et par M. Frank[2], ces fila-

1. *Bull. de la Société botan. de France*, t. XXVI, p. 98, 1879.
2. *Botan. Zeitung*, 1879, p. 377.

ments ont été l'objet d'observations très soignées de la part de M. Vuillemin[1] et surtout de M. Marshall Ward[2], qui les vit pénétrer dans les racines par les poils radicaux. Il est difficile de comprendre l'opinion de M. Beyerinck[3], qui, s'attachant surtout à l'étude biologique des bactéroïdes, fut porté à considérer les filaments muqueux comme les restes des tonnelets nucléaires. M. Tschirch[4] avait, quelque temps auparavant, adopté une opinion analogue.

M. Kny[5] et M. Prillieux considéraient ces productions comme semblables à celles que donnent certains myxomycètes, entre autres le *Plasmodiophora Brassicæ*, qui cause la hernie des racines de plusieurs crucifères.

M. Prazmowski[6] voit dans les filaments intracellulaires des formations protoplasmiques appartenant au microbe des tubercules, et dans lesquelles des bactéries spécifiques naissent et se multiplient avant de se transformer en bactéroïdes. Les cordons protoplasmiques seraient donc des sortes de zooglées.

Récemment, M. Frank[7] a émis une opinion entièrement différente : la légumineuse produirait les filaments, dans le protoplasme desquels les bactéroïdes prendraient naissance sous l'influence de *Micrococcus* particuliers.

Dès 1874, M. Eriksson[8] avait identifié les filaments dont il vient d'être question à un véritable mycélium pourvu d'une membrane cellulosique propre. L'existence d'une telle membrane a été de nouveau affirmée par M. Vuillemin[9], M. Pichi[10] et plus récemment, par M. A. Koch[11]. Ces savants ont pu la découvrir après avoir traité des coupes par l'hypochlorite de soude ou l'eau de Javel, et ensuite par le chlorure de zinc iodé.

1. *Annales de la Science agronomique*, 5e année, t. II, p. 121, 1888.
2. *Philosoph. Transactions of the Roy. Society of London*, B, vol. 178, p. 539, 1887, et *Proceedings of the Roy. Society*, vol. XLVI, p. 431, 1889.
3. *Botan. Zeitung*, 1888, nº 46 à 50.
4. *Berichte d. deutsch. botan. Gesellsch.*, t. V, 1887.
5. *Botan. Zeitschrift*, 1879, p. 57.
6. *Botan. Centralbl.*, XXXVI, 1888, et Die Wurzelknöllchen der Erbse, *Landwirtsch. Versuchs-Stationen*, XXXVII, p. 161, 1890.
7. *Berichte de deutsch. botan. Gesellsch.*, t. VII, p. 332, 1889, et Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen, *Landwirthsch. Jahrbüchern*, 1890.
8. Studier öfver Leguminernas rotknölar, Lund, 1874,
9. *Loc. cit.*, p. 189.
10. *Atti d. Societa Toscana d. scienze natur.*, 1888.
11. *Botan. Zeitung*, 1890, p. 607.

Cependant, la présence d'une enveloppe cellulosique ne termine pas toute discussion sur la nature du microbe des nodosités. Plus d'un point important relatif à la morphologie de cet organisme est resté jusqu'ici des plus controversés.

Dans l'étude des nodosités et des êtres vivants qui les habitent, il importe de renoncer aux moyens employés d'habitude pour les travaux histologiques. Ainsi l'immersion dans l'alcool donne de mauvais résultats; les filaments deviennent alors très difficiles à distinguer au milieu du contenu cellulaire coagulé. Mieux vaut ne les étudier que sur des coupes fraîchement préparées. L'iode suffit pour les rendre plus apparents; ce réactif les colore en jaune. Les couleurs d'aniline ordinairement employées ne conviennent guère, parce qu'elles n'ont d'action que sur le protoplasme mort. Il en est tout autrement du violet dahlia, cet excellent réactif que M. Certes a fait connaître comme capable de colorer les protoplasmes vivants.

Des coupes très minces de nodosités de Pois, de Fève, de Gesse cultivée, etc., etc., plongées pendant quelques minutes dans une solution aqueuse de violet dahlia, m'ont donné d'excellents résultats. Dans toutes les cellules du parenchyme à bactéroïdes, l'existence des filaments muqueux est alors des plus nettes. Ils traversent les cellules, et présentent le plus souvent un épaississement local au niveau des cloisons cellulosiques qu'ils traversent. Pour M. Frank, cette particularité, de même que la forme amincie et pointue de certains rameaux, s'expliquait (1879) par l'étirement des filaments dans les cellules en voie de croissance. Certes, il y a une part de vérité dans cette interprétation; mais il est aussi vrai que les filaments protoplasmiques s'appliquent fréquemment contre les parois des cellules qu'ils traversent (voir pl. II, fig. 7 et 11). Grâce à la coloration par le violet, on les voit parfois se diviser en ramuscules très délicats qui se perdent dans le protoplasme environnant.

Un fait beaucoup plus important m'a été révélé par l'emploi du violet dahlia. Les productions arrondies que présentent les filaments ont été considérées dès 1879 comme des suçoirs par M. Frank. Pour M. Prazmowski, ce sont des sortes de sporanges où s'accumulent les bactéries avant de se répandre dans les cellules extérieures.

Ni l'une ni l'autre de ces opinions ne sont exactes. En effet,

le violet dahlia employé en solutions aqueuses diluées donne, après quelques minutes, à la plupart des masses globuleuses, un aspect mamelonné, parfois hérissé, que l'on ne pourrait que très difficilement soupçonner en l'absence de coloration. Chacune présente un certain nombre de ramifications très courtes dont les stérigmates des *Aspergillus* nous donnent une idée assez exacte.

Cette observation, faite en premier lieu sur la Gesse cultivée et sur le Pois, fut vérifiée sur une assez grande quantité de Papilionacées. Toutes les espèces ne conviennent pas d'une manière égale; ainsi chez la Fève, les petites aspérités en question sont peu apparentes, et l'organe qui les porte a plutôt l'aspect d'une mûre.

L'observation de ces rameaux hérissés de pointes très courtes et très délicates me fit tout de suite supposer que c'était sans doute là l'origine des bactéroïdes. Le pressentiment était des plus fondés. D'innombrables coupes furent faites avec soin dans des nodosités d'âge variable de Gesse cultivée et de Pois. Je finis par découvrir un certain nombre de renflements muqueux auxquels des bactéroïdes typiques étaient encore attachés. J'ai représenté, planche II, plusieurs de mes observations.

Ce n'est pas tout. L'existence de ces stérigmates à bactéroïdes me fit observer avec plus d'attention certaines aspérités que j'avais remarquées le long des filaments muqueux; elles sont souvent groupées en petit nombre vers l'extrémité amincie de certains de ces filaments. Bientôt, j'acquis encore la conviction que ces petites pointes latérales se continuent parfois en filaments très minces qui se perdent dans le protoplasme cellulaire; je les ai vues aussi en continuité évidente avec des bactéroïdes; d'autres se terminent brusquement à peu de distance de leur insertion, ce qui permet de supposer que leurs productions spéciales ne s'étaient pas encore formées ou venaient de s'en détacher.

Voici encore un détail qui confirme la production des bactéroïdes par les filaments protoplasmiques : dans l'examen des préparations, il m'est arrivé de rencontrer des cellules laissées intactes par le rasoir et dans lesquelles un petit nombre de bactéroïdes environnaient les renflements muqueux.

Ce n'est pas une opinion nouvelle que de considérer les

bactéroïdes comme des productions bourgeonnantes des filaments observés dans les nodosités. L'idée fut d'abord émise par M. Kny (*loc. cit.*), puis par M. Frank (*loc. cit.*), qui l'abandonna depuis pour une opinion toute différente. M. Marshall Ward l'a reprise sans l'affirmer d'une manière catégorique : les bactéroïdes semblent, dit-il, naître des hyphes par bourgeonnement (*loc. cit.* p. 547).

Les observations du botaniste anglais devaient rencontrer peu de crédit. On révoquait même en doute l'autonomie biologique de ces corpuscules.

Comme je l'ai exposé plus haut, il est très facile, à l'aide du violet dahlia, d'observer les filaments du microbe des nodosités. Le moment est venu de faire une remarque qui n'est pas sans intérêt. Dans les nodosités des Lupins et du Haricot commun, l'existence des hyphes a été niée par maints observateurs. Ils étaient de bonne foi, mais la prudence ne permettait pas de conclure avec autant de précipitation. M. Brunchorst[1] a également contesté la présence des hyphes chez le Haricot d'Espagne, la Podalyre, le *Desmodium canadense* et deux autres espèces peu connues.

M. Prazmowski[2] a signalé la présence de ces filaments dans les nodosités du *Lupinus perennis* et du *Phaseolus vulgaris*. J'ai fait la même constatation pour le *Lupinus luteus* et le *Phaseolus multiflorus* sur des coupes colorées par le violet dahlia (voyez pl. I, fig. 2, 3 et 4). Chez ces espèces, les filaments disparaissent de bonne heure, et ne laissent d'autre trace que de rares amas protoplasmiques de forme très irrégulière. Cette destruction plus ou moins complète des hyphes est assez générale, et se fait quelque temps après la production des bactéroïdes. Dans l'intervalle, les noyaux des cellules à bactéroïdes se désorganisent, comme le prouve la diminution du pouvoir chromatique dans les tissus adultes.

Je reviendrai de nouveau sur le cas des Lupins dans le chapitre suivant, et je démontrerai par une voie différente la parenté qui existe entre les organismes des tubercules des Lupins et ceux des autres légumineuses.

1. *Berichte d. deutsch., botan. Gesellsch.*, t. III, 1885.
2. *Botan. Centralblatt*, XXXVI, p. 252.

II

DÉVELOPPEMENT DE NODOSITÉS A LA SUITE D'INOCULATIONS.

Ce fut M. Prillieux qui remarqua le premier que le développement des nodosités sur les racines de Légumineuses peut être provoqué par l'introduction, dans le milieu de culture, de racines pourvues de semblables organes. La même observation fut faite presque simultanément par M. Frank.

Déjà à cette époque, on pouvait pressentir la nature vivante de la cause qui produit les tubercules. MM. Hellriegel et Wilfarth [1] ont confirmé cette opinion par leurs nombreux essais de culture dans le sable, avec ou sans ensemencement de germes du microbe provenant soit des tubercules, soit d'une terre qui avait porté des légumineuses.

D'autres essais d'inoculations ont ensuite été entrepris par M. Marshall Ward, M. Prazmowski; M. Beyerinck, M. Bréal [2], et par moi-même [3].

Pour ma part, j'ai fait, cette année, plusieurs centaines d'essais de culture avec la variété de Pois nain de Grâce ou Gonthier, dont la tige ne dépasse guère 30 centimètres de hauteur. Mes essais m'ont permis de faire quelques remarques que je crois utile de signaler.

En premier lieu, je me suis appliqué à démontrer rigoureusement que l'intervention d'un germe est nécessaire au développement des nodosités. C'est là une vérité que différents auteurs ont cru établir, sans toutefois apporter des preuves tout à fait concluantes, parce qu'ils n'opéraient pas dans des conditions de stérilité absolue.

Or, en pareille matière, on a le droit de penser que toutes les probabilités, si grandes qu'elles soient, n'équivalent pas à une certitude, et qu'il est besoin de preuves décisives. C'est dans l'intention de les donner que j'ai fait croître des pois nains dans des conditions complètes de stérilité [4].

1. *Untersuchungen uber die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminösen.* Berlin, 1888.
2. *Annales agronomiques*, t. XIV, p. 481, 1888, et t. XV, p. 529, 1889.
3. *Bulletin de l'Académie royale de Belgique*, 3e série, t. XIX, p. 764, 1890.
4. Dans le numéro du 26 décembre dernier de la *Botan. Zeitung*, M. Beyerinck a décrit un procédé différent de celui que j'ai adopté, pour cultiver des plantes à l'abri des microbes.

Les graines avaient été d'abord stérilisées par l'immersion, pendant quinze minutes, dans une solution à 1°/₀₀ de sublimé, contenue dans de larges tubes à essais; c'est dans ces tubes bien lavés à l'eau stérilisée que se fit la germination.

Le mélange nutritif que j'ai employé était composé de :

Eau distillée	1000 cc.
Sulfate de magnésium	0,5 gr.
— de potassium	0,5
— de calcium	0,5
— de fer	0,01
Phosphate tricalcique	0,5
Chlorure de sodium	0,5

Le mélange était renfermé dans des éprouvettes de 200 ou de 350 centimètres cubes, fermées par un bouchon plat coupé en deux moitiés. Entre celles-ci, dans une petite ouverture centrale, était fixée avec un peu d'ouate la partie inférieure de la tige.

Les bocaux des cultures stérilisées étaient fermés d'une façon hermétique avec des bouchons choisis avec le plus grand soin. Ils furent, après remplissage, chauffés à l'autoclave; lorsqu'ils furent refroidis, j'introduisis avec précaution la radicule des plantules germées en tubes stériles entre les deux moitiés du bouchon; enfin, du coton stérile entourait la radicule de manière à empêcher le passage des germes.

La graine se trouvait ainsi placée au-dessus du bouchon; afin d'éviter la dessiccation, le bocal fut placé pendant dix jours dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau.

Six pois ainsi cultivés se sont développés d'une manière normale; les racines étaient plus longues, même plus ramifiées que celles des pois inoculés et pourvus de nodosités. Quant aux tiges, elles avaient une douzaine de feuilles, qui sont devenues jaunâtres après l'épuisement des graines. Chaque tige a donné de deux à quatre fleurs, dont une seule a noué et a donné une graine plus petite que celle qui avait été semée. L'analyse de deux de ces plantes n'a indiqué qu'un enrichissement minime en azote.

Azote des deux graines	19 mgr.
— des plantes récoltées	20,5 mgr.

A la fin de la culture, j'ai vérifié la stérilité des mélanges nutritifs par des ensemencements sur milieux gélatinisés appropriés; cinq se sont montrés stériles; le sixième contenait du *Mucor racemosus*.

Si l'on compare les racines d'un pois privées de nodosités avec celles d'un autre qui a été inoculé avec succès, on est toujours frappé de la ramification plus abondante des premières. La plante multiplie ses organes d'absorption comme si elle était prévenue de l'insuffisance de son alimentation. Telle est également la ramification de maintes espèces cultivées dans l'eau distillée et dans les sols stériles.

Nous sommes donc certains qu'un organisme particulier est indispensable à la production des nodosités. On a cru et dit que

c'est l'une des bactéries banales qui vivent et pullulent dans le sol. Il n'en est rien, comme je m'en suis assuré par l'inoculation, à des pois maintenus jusque-là stériles, de plusieurs races de ces microbes, provenant du sol et de l'air et qui avaient été isolées avec le plus grand soin. Jamais la moindre nodosité ne s'est développée sur les racines soumises à ce traitement. C'est donc à tort que l'on a identifié les microbes des nodosités avec des bactéries ubiquistes.

Je viens d'attirer l'attention sur l'allongement et la ramification plus touffue des racines des pois qui ne sont pas infectés. Une différence non moins curieuse s'observe sur les pieds cultivés dans le mélange nutritif additionné de nitrate de sodium ou de sulfate d'ammoniaque à 1°/₀₀. Les pois souffrent dans ce dernier mélange, mais ils sont très prospères en présence de nitrate de sodium; leurs tiges sont vigoureuses et robustes; leurs feuilles larges et d'un vert foncé; les fleurs nouent parfaitement. Quant aux racines, elles sont ramifiées en proportion du développement foliaire, mais ne présentent qu'un très petit nombre de tubercules.

Des observations analogues avaient été faites depuis longtemps par M. de Vries [1] sur le Trèfle rouge, et plus récemment par M. Schindler [2] et Vines [3]. Ces auteurs avaient observé que beaucoup de légumineuses, cultivées dans des sols riches en engrais azotés, ne portent presque pas, parfois même pas du tout de nodosités radicales. Dans ce cas, ces plantes se conduisent comme si elles avaient conscience de l'inutilité de leur association avec le microbe des nodosités. Je reviendrai sur ce point au chapitre IV, et dirai comment je le comprends.

Il n'y a pas que les substances azotées qui fassent sentir leur influence sur la production des nodosités; celle-ci dépend encore des matières salines qui existent dans le milieu ambiant.

Pour mettre en lumière cette action des substances minérales, j'ai cultivé des pois dans l'eau distillée et dans des solutions privées de soufre, de phosphore, de potassium, de calcium, de magnésium ou de fer ; j'avais soin d'ajouter au liquide quelques nodosités écrasées pour en faire sortir le suc.

1. *Landwirth. Jahrbücher*, t. VI, 1877.
2. *Botan. Centralblatt*, t. XVIII, 1886.
3. *Annals of Botany*, vol. II, 1888-89.

L'absence d'acide phosphorique, de chaux et de magnésie détermine une végétation rabougrie et supprime l'aptitude à produire des nodosités. Sans potasse et sans fer, les plantes poussent mieux, les racines sont ramifiées et assez vigoureuses, mais ne portent guère de tubercules. Pour ce qui est du soufre, ni la végétation des pois ni le développement des nodosités ne paraissent se ressentir de son absence, sans doute parce que la graine renferme une quantité suffisante de cet élément. Il convient de remarquer à ce propos que les graines de Pois sont particulièrement pauvres en chaux et en magnésie, et beaucoup plus riches en potasse.

Dans l'eau distillée, les plantes se comportent beaucoup mieux que dans les solutions privées d'acide phosphorique, de chaux ou de magnésie ; même leurs racines sont pourvues de quelques nodosités. C'est, du reste, un résultat qui est conforme à ce que l'on observe lorsqu'on fait des cultures aqueuses de maïs ou d'avoine comparativement dans l'eau distillée et dans des mélanges privés de chaux ou de potasse. Les plantes croissent mieux dans l'eau pure que dans ces derniers milieux. Il semble alors que certaines combinaisons salines, utiles dans le mélange nutritif complet, aient la propriété de nuire à l'utilisation des réserves de la graine.

L'influence si marquée des phosphates et des sels de calcium et de magnésium sur la croissance des pois et leur aptitude à donner des nodosités mérite d'attirer l'attention, et n'est pas sans avoir une certaine importance pratique.

J'ai signalé plus haut la réussite constante des cultures de pois inoculées avec le contenu des nodosités. Rien n'est plus facile que d'obtenir, à jour fixe, des pieds pourvus de nodosités radicales. Lorsque les essais ne doivent pas être faits dans des conditions de pureté absolue, il suffit de faire germer des graines de Pois nains, variété de Grâce, sur une toile à larges mailles tendue au-dessus d'un cristallisoir rempli d'eau et placé sous une cloche. Quand les radicules ont 5 à 8 centimètres de longueur, on les pique avec une pointe de verre ou même une aiguille ordinaire plongée, au préalable, dans une nodosité de pois ou d'une autre légumineuse. Lorsque le temps est favorable à la végétation, les premières nodosités apparaissent sur les

racines environ dix jours après l'inoculation. Ces tubercules se trouvent dipersés sur les racines et non pas limités au voisinage des points d'infection. Cela n'a rien d'étonnant, car une partie des germes apportés par l'opération peuvent se mélanger au liquide de culture. Le microbe envahisseur peut aussi se propager de proche en proche dans l'intérieur des tissus, comme je l'établirai plus loin (IV).

Lorsqu'on se contente de déposer la semence dans le liquide sans blesser l'écorce des racines, il faut généralement deux à quatre jours de plus avant de voir apparaître les premières nodosités. Les microbes trouvent une porte d'entrée toute préparée dans les racines blessées, tandis qu'ils doivent pénétrer dans celles qui sont intactes.

Enfin, j'ai remarqué qu'un délai de quelques jours est nécessaire lorsqu'on remplace, dans les inoculations par piqûre, le contenu de nodosités par un peu de terre qui a porté des légumineuses. Il semble que le microbe se trouve dans la terre à l'état de repos, et qu'il mette un certain temps avant de pouvoir entamer les racines de la plante hospitalière.

La semence nécessaire aux inoculations ne doit pas nécessairement être empruntée à l'espèce que l'on se propose d'infecter. Ainsi, j'ai inoculé avec succès des Pois nains avec des nodosités prises sur les espèces indiquées ci-dessous. Quelle que soit la nature de l'espèce qui a fourni la matière inoculée, il se développe toujours des nodosités ; le nombre et les dimensions de celles-ci varient avec la nature des espèces auxquelles on a emprunté la semence.

Le tableau suivant résume les résultats de mes observations faites dans cet ordre d'idées. Je crois utile de faire remarquer que les nodosités servant aux inoculations étaient plongées pendant dix minutes dans une solution de sublimé à 1 $^{0}/_{00}$; parfois, elles étaient simplement lavées vivement au moyen d'un jet d'eau stérilisée lancée au point où j'allais percer la nodosité ; il m'est aussi arrivé de stériliser cet endroit au moyen d'un objet en métal porté au rouge.

NATURE DES ESPÈCES QUI ONT FOURNI LA SUBSTANCE INOCULÉE AUX POIS	REMARQUES FAITES SUR LES NODOSITÉS
Acacia leptophylla.	Nombreuses, de moyenne grosseur.
— *suaveolens.*	» »
Mimosa saligna.	» »
Dolichos melanophthalmus.	» »
Haricot commun (*Phaseolus vulgaris.*)	» » »
Pois (*Pisum sativum.*)	» et grosses.
Gesse cultivée (*Lathyrus sativus.*)	»
— odorante (— *odoratus.*)	» »
— sans feuilles (*Lathyrus aphaca.*)	»
Fève (*Faba vulgaris.*)	» »
Lentille (*Ervum Lens.*)	Rares et petites.
Baguenaudier (*Colutea arborescens.*)	Assez nombreuses et grosses.
Psoralea acaulis.	Quelques-unes, grosses.
Lotus uliginosus.	Nombreuses et grosses.
— *Jacobæus.*	» de moyenne grosseur.
Tetragonolobus purpureus.	» » »
Securigera corallina.	» » »
Trifolium incarnatum.	» et grosses.
— *pratense.*	» »
— *repens* (trèfle blanc.)	Nombreuses et grosses.
— *elegans.*	» et assez petites.
— *subterraneum.*	Rares et petites.
Melilotus albus.	» et grosses.
— *officinalis.*	» »
Limaçon (*Medicago scutellata.*)	Nombreuses et assez petites.
Lupuline (— *lupulina.*)	Rares et grosses.
Luzerne (— *sativa.*)	» »
Medicago orbicularis.	» »
— *maculata.*	» »
Genista sibirica.	» »
— *spachiana.*	» »
Lupinus luteus.	»
— *Cruikshanksii.*	» »
— *tricolor.*	» »
— *elegans.*	» »
— *albus.*	» »

Ces renseignements montrent que les espèces qui conviennent le mieux pour communiquer au Pois l'aptitude à produire des tubercules sont le Pois, la Fève, les Gesses, les Acacias, les Lotiers et certaines espèces de Trèfle. Par contre, les Mélilots, les *Medicago*, les Genêts et surtout les Lupins sont beaucoup moins favorables aux essais d'inoculations avec le Pois.

Les divers genres indiqués au tableau sont rangés selon leurs affinités botaniques. Après examen comparatif des résultats, on est porté à croire que le microbe des tubercules se propage

mieux sur les racines d'une espèce de légumineuse, lorsque celle-ci n'est pas trop différente de l'espèce qui a fourni la semence. Il ne convient cependant pas d'exagérer cette remarque, car le développement des nodosités dépend aussi de l'âge des tubercules inoculés aux racines à infecter.

Influence de l'âge des nodosités. — Dans les essais d'inoculations rapportés au tableau, la semence était toujours empruntée à des tubercules jeunes, en voie de croissance. Souvent même, ceux-ci étaient percés avec une pointe en verre à l'endroit où le parenchyme continue à se diviser; le microbe y est encore à l'état de vie très active. Il en est tout autrement lorsque la substance inoculée provient d'un tissu adulte, d'une nodosité qui cesse de s'accroître. Aussi, pour assurer le succès des inoculations, il importe de les pratiquer avec des tubercules récoltés sur des plantes dont la végétation n'est pas trop avancée. C'est M. Beyerinck qui signala le premier ce fait intéressant. Dès que les fleurs commencent à se former, la vitalité du microbe diminue sensiblement; il met plus de temps à se développer, à produire des tubercules, et en donne une quantité moindre. Plus tard, beaucoup d'inoculations restent stériles sur les racines du Pois. Le microbe trahit une sorte de malaise, et les germes qui restent dans le tissu des tubercules ne pourront évoluer qu'après avoir traversé une période de repos dans la terre.

Ces faits ont été vérifiés de nombreuses fois avec des nodosités de Pois et de Fève en boutons, en fleurs ou en fruits. Ils pourraient faire supposer que les racines des Légumineuses ne constituent pas l'habitat naturel du microbe des nodosités, et qu'il n'y peut vivre indéfiniment. Des observations analogues ont été faites pour la vie anaérobie de la Levure par M. Cochin. Une telle hypothèse ne serait pourtant pas justifiée, car le microbe des Léguminenses peut être propagé sur des pois pendant plusieurs mois, lorsqu'on a soin d'employer des nodosités très jeunes pour les inoculations successives.

Formation de races chez le microbe des nodosités. Non seulement la nature spécifique des plantes qui fournissent les nodosités inoculées retentit sur le nombre et les dimensions des tubercules chez le Pois, mais encore sur l'aspect des bactéroïdes. Comme M. Beyerinck l'a mis en évidence, l'aspect de ces corpuscules diffère sensiblement chez les diverses espèces de Légumineuses ;

leur grosseur est assez variable, leur forme tantôt simple, tantôt plus ou moins ramifiée. Ces caractères sont assez constants chez la même espèce; les exceptions qui se rencontrent dans la nature s'expliquent sans difficulté de la manière suivante. Après avoir habité une espèce, le microbe s'en ressent dans sa descendance, tout au moins pendant une génération. Voici qui le prouve.

Un certain nombre de nodosités, dont il est question au tableau de l'avant-dernière page, furent broyées et examinées au microscope. Les bactéroïdes, quoique développés sur le Pois, offraient des différences assez sensibles pour un œil exercé. La figure 2 en donne une idée assez exacte.

Fig. 2. — Gross. 700.

a, Bactéroïdes de pois inoculé avec nodosités de Haricot vulgaire.
b, Id : avec nodosités de Limaçon.
c, Id : avec nodosités d'*Acacia Leptophylla*.

Il m'a paru exister une certaine analogie entre ces diverses formes de bactéroïdes et celles qui sont propres aux différentes espèces de Légumineuses. De nouvelles observations m'éclaireront définitivement sur ce point.

Quoi qu'il en soit, les différences entre les microbes observés dans les nodosités ne sont pas assez tranchées pour qu'il soit opportun d'y voir plus d'un type spécifique. La race propre aux Lupins ne réussit guère à s'implanter sur les racines des Pois. Elle se distingue, en outre, comme je l'ai dit plus haut, par la durée éphémère des filaments mycéliens et la prédominance des bactéroïdes. Cependant, inoculée sur le Pois, elle y produit des nodosités au milieu desquelles abondent des filaments très irréguliers et plus durables que dans les nodosités des Lupins. (Voir pl. I. fig. 5.)

Peut-être, cette race pourrait-elle s'accoutumer à la longue sur le Pois et s'y développer d'une façon plus régulière. Je m'étais proposé d'examiner ce point par une série de cultures

successives sur des pois, mais l'hiver est venu les interrompre.

Dispersion du microbe dans la terre. Toutes les terres ne renferment pas les germes du microbe des nodosités. C'est là un fait qui tend à prouver que ce n'est pas un organisme saprophyte et ubiquiste, qui vit passagèrement à l'état de symbiose dans les racines des plantes supérieures.

Déjà M. Hellriegel a démontré, surtout pour le Lupin jaune et aussi pour la Serradelle, que les terres qui n'ont pas porté de légumineuses ne conviennent pas aux ensemencements faits en vue d'infecter les racines de ces végétaux. Pour les Lupins, on peut admettre que dans les terrains qui jusque-là en ont été privés, le développement des nodosités est tout à fait exceptionnel. Des centaines de pieds cultivés depuis deux ans dans le jardin de l'Institut Pasteur, où, sans doute, on n'a jamais cultivé de lupins, ne m'ont présenté qu'une seule nodosité de très petite taille. A côté, des Fèves, des Pois, des Gesses et des Haricots avaient des racines plus ou moins riches en tubercules. Pour peu que l'on fasse attention lors de l'arrachage de légumineuses cultivées côte à côte, on observe que les unes sont mieux pourvues que les autres de la même espèce. Et dans les sols pauvres en azote, tel que le sable, la vigueur de la croissance coïncide constamment avec l'abondance des nodosités sur les racines. C'est même cette remarque qui conduisit M. Hellriegel à sa célèbre découverte.

L'absence de tubercules sur les racines des Lupins cultivés à côté de Pois ou de Fèves qui sont pourvus de ces organes est encore une preuve de l'existence de races physiologiquement distinctes chez le microbe des nodosités. Tels germes répandus dans la terre cultivée envahissent les racines de maintes espèces, et sont cependant incapables de vivre en symbiose avec les Lupins.

Dans les terres cultivées, les germes capables de se développer sur les racines des Pois, et vraisemblablement de la plupart des Légumineuses autres que les Lupins, ne sont pas répandus d'une manière uniforme. J'ai eu l'occasion de m'en assurer par des cultures en solutions aqueuses, dans lesquelles j'avais introduit un peu de terre recueillie dans des carrés du jardin botanique de Bruxelles consacrés depuis soixante ans à la culture de plantes autres que les Légumineuses. Dans ces conditions, les

pois n'ont donné qu'un très petit nombre de nodosités, dont le vent avait sans doute apporté les germes à la surface du sol.

Tout nous fait donc supposer que les microbes fixateurs d'azote ne vivent pas à l'état autonome dans la terre, et que leurs germes n'y sont introduits que par la pourriture des nodosités. C'est là une vérité dont les agriculteurs devront se souvenir toutes les fois qu'ils ensemenceront des légumineuses, surtout des Lupins, dans des champs qui, jusque-là, en avaient été privés.

III

NATURE DU MICROBE DES NODOSITÉS.

L'idée que les nodosités des légumineuses résultent de l'intervention d'un microbe fut introduite dans la science par M. Woronin [1] en 1866. Ce botaniste considérait les corpuscules bactériformes du parenchyme des tubercules comme de véritables bactéries.

En 1874, M. Ericksson observe dans le tissu central de jeunes nodosités des filaments mycéliens intracellulaires, et il les voit même traverser l'écorce des jeunes racines.

Pour M. Kny et M. Prillieux, ces filaments sont de même nature que certains plasmodes de Myxomycètes, comparaison que motivait la difficulté d'observer la membrane propre des filaments mycéliens. Quant aux bactéroïdes, ce seraient des formations de ces prétendus plasmodes.

Quant à M. Frank, il supposait, dès 1879, que les bactéroïdes sont des bourgeons produits par les hyphes ; il niait tout mouvement propre à ces corpuscules et donnait au champignon le nom de *Schinzia leguminosarum*. Plus tard, le même botaniste a refusé le caractère d'organismes aux bactéroïdes, et les a considérés comme des corps albuminoïdes formés dans le protoplasme des cellules des tubercules.

Cette opinion est due à M. Brunchorst [2], qui considérait

1. *Annales des Sciences natur., Botanique*, t. VII, 1866.
2. *Berichte d. deutsch. botan. Gesellsch.*, t. III, 1885.

aussi les filaments comme de nature mycélienne, mais sans aucune relation avec les corpuscules bactériformes.

Hellriegel reprend l'idée que les bactéroïdes sont réellement des bactéries, mais il ne se fonde que sur leurs apparences. A la suite des recherches du chimiste allemand sur la nutrition azotée des Légumineuses, beaucoup d'observateurs ont admis son avis sur la nature du microbe des nodosités.

Cependant M. Marshall Ward met en évidence les filaments mycéliens; il les voit pénétrer par les poils radicaux de la Fève dans le parenchyme des racines et en provoquer l'hypertrophie. M. Ward considère les bactéroïdes comme des bourgeons (gemmules) produits par les filaments mycéliens, sans toutefois indiquer ce fait comme démontré par des observations certaines.

La même année, M. Tschirch défend l'opinion de M. Brunchorst, et l'exagère même au point de nier la nature mycélienne des filaments intracellulaires; ils n'étaient, à son avis, autre chose que des débris protoplasmiques.

Bien que favorable à l'idée que les bactéroïdes ne sont pas des êtres vivants, M. Vuillemin étudie principalement les filaments mycéliens, qu'il attribue à une Chytridiacée.

C'est sans doute sous l'impression des travaux de M. Brunchorst et de M. Tschirch que M. Beyerinck considère les filaments du tissu des nodosités comme des cordons muqueux provenant de la division des noyaux. Il accorde la plus grande attention aux bactéroïdes, qu'il range parmi les Bactéries sous le nom de *Bacillus radicicola*. Le même savant en a obtenu les premières cultures pures sur des bouillons de légumineuses gélatinisés et additionnés d'asparagine.

Au § Ier, j'ai indiqué les opinions de M. Prazmowski et de M. Frank sur la nature des filaments et des bactéroïdes. Ce dernier assure [1] que le Haricot commun, en sol stérilisé, donne des nodosités contenant des bactéroïdes. Je n'ai pu, pas plus que M. Prazmowski [2], vérifier cette assertion par des cultures de trois variétés de haricots faites dans le sable chauffé à 120° et dans la solution nutritive stérilisée par le même procédé. Aucune précaution spéciale n'avait même été prise contre les

1. *Berichte der deutsch. bot. Gesellsch.* VII, p. 336, 1889.
2. *Die landwirtsch. Versuchs-Stationen*, XXXVIII, p. 59, 1890.

germes que l'air pouvait apporter. Néanmoins, je ne pus découvrir la plus petite nodosité sur les racines de douze haricots ainsi cultivés.

Telles sont les opinions successivement émises depuis le travail de M. Woronin sur la nature du microbe des tubercules des Légumineuses. Il n'est pas sans intérêt de faire remarquer que dans cette question, comme dans tant d'autres, la vérité a été devinée ou entrevue, à plusieurs reprises, par différents observateurs (M. Kny, M. Frank, 1879, et surtout M. Marshall Ward); celui-ci toucha presque du doigt la solution du problème.

Ainsi que je l'ai établi au chapitre Ier, le microbe des nodosités est constitué par des filaments qui traversent l'écorce des racines et qui, après une abondante ramification, produisent par bourgeonnement les bactéroïdes. Dans la suite de ce travail, je désignerai cet organisme sous le nom de *Rhizobium leguminosarum*, donné par M. Frank aux bactéries qui, d'après lui, existent dans les tubercules. Inutile de dire que nous différons complètement sur les caractères morphologiques du *Rhizobium*.

Culture du Rhizobium. Les contradictions signalées dans l'étude morphologique du microbe des tubercules se retrouvent dans les résultats des essais de culture entrepris par plusieurs expérimentateurs. Confiants dans l'aspect de cet organisme, quelques-uns ont cru avoir réussi à le cultiver avec une facilité sujette à caution. Je m'empresse d'affirmer que les essais si heureux tentés par M. Beyerinck et puis par M. Prazmowski sont à l'abri de tout reproche.

De même que dans toutes les recherches de microbiologie, il est dans l'étude du *Rhizobium* tout à fait nécessaire de recourir aux cultures d'une pureté absolue, afin d'écarter toute confusion possible avec les bactéries banales.

Le meilleur critérium pour s'assurer de la pureté d'une culture du *Rhizobium* est d'en faire des inoculations à de jeunes Pois. Au chapitre II, j'ai déjà annoncé que les bactéries banales ne peuvent déterminer la formation de tubercules sur les racines du Pois. Elles ne les empêchent pourtant pas, ainsi que j'ai eu l'occasion de m'en assurer au début de mes recherches, lorsqu'elles sont inoculées à l'état de mélange avec le *Rhizobium*. Mais les cultures pures sont d'un effet plus sûr, et voici comment j'ai réussi à en obtenir.

Sur les racines des pois cultivés dans les solutions nutritives, j'ai coupé quelques fragments pourvus de nodosités pas trop avancées, mais contenant déjà des bactéroïdes. Je les ai plongés dans une solution de sublimé à 1 ‰, et, après dix minutes, lavées à trois reprises avec de l'eau stérilisée à 120°. Les fragments de racines avec leurs tubercules ont ensuite été broyés avec un agitateur préalablement flambé; quelques gouttes du mélange aspirées avec un tube capillaire ont été introduites dans les milieux de culture.

Ce procédé m'a paru meilleur que celui que j'avais suivi d'abord, et qui consistait à percer les nodosités stérilisées avec un tube capillaire; souvent, des microbes étrangers pénètrent dans les cultures pendant les manipulations. Un avantage plus important encore, c'est que le broyage permet de mélanger les bactéroïdes d'âges différents, et dont l'aptitude au développement est fort inégale.

Quant au milieu de culture, je me servais de prime abord de bouillon de pois gélatinisé et additionné d'asparagine, d'après les indications de M. Beyerinck. Mais cette substance amidée ne s'est pas montrée bien nécessaire, ni même avantageuse dans des cultures comparatives.

Sur bouillon de pois gélatinisé, le développement des colonies est assez inégal. On voit côte à côte, et à la surface de la gélatine nutritive, des colonies très petites formées de cellules peu nombreuses, tandis que d'autres atteignent un diamètre de près d'un millimètre. Cette différence tient sans aucun doute à l'état physiologique des bactéroïdes au moment de l'ensemencement. Les plus petites colonies sont arrondies, les plus grandes m'ont présenté plusieurs fois des contours sinueux qui rappellent les colonies de la forme-levure de *Cladosporium*, que j'ai figurées naguère dans ces *Annales* (t. II, p. 584. Voir pl. II, fig. 12).

Ces formes de développement sont très rares; je me suis assuré qu'elles étaient bien dues au *Rhizobium*, par le procédé des inoculations au Pois, et en y constatant la présence des formes ramifiées des bactéroïdes.

M. Prazmowski indique une membrane très mince qui enveloppe les jeunes colonies. Au moment de mes recherches, mon attention n'a pas été attirée sur ce point. Ce qui m'a frappé, c'est l'extrême viscosité des colonies les plus vigoureuses. Elle

est due à une substance glaireuse qui environne les éléments cellulaires, et qu'un examen superficiel pourrait faire considérer comme de nature protoplasmique. Elle absorbe avec énergie le violet dahlia, se colore en jaune par l'iode, et ne présente pas la réaction de la cellulose avec ce réactif et l'acide sulfurique.

Dans une note récente [1], M. Prillieux a cherché à établir une analogie entre le dépôt visqueux dans lequel sont plongés les bactéroïdes cultivés et le plasmode qu'il décrivit autrefois dans les tubercules. Cette opinion me paraît difficilement acceptable; tout fait supposer que la matière qui rend le liquide filant est l'une de ces nombreuses substances visqueuses si répandues dans le monde des microbes.

Nous la retrouverons, d'ailleurs, dans les cultures liquides auxquelles le microbe communique la viscosité.

Les colonies du *Rhizobium* sur gélatine sont blanchâtres et leur surface semble glacée; on peut assez facilement les reconnaître dans un mélange de bactéries banales lorsqu'on a une grande habitude de la culture de ces organismes.

En tube de gélatine, ensemencée par piqûre, les bactéroïdes donnent une trace peu marquée qui diminue avec la profondeur.

Dans les bouillons de pois non gélatinisés, un dépôt visqueux se forme au fond des matras de culture, et on y retrouve, au microscope, les formes en Y, en T, et même les formes les plus compliquées des bactéroïdes observées dans les nodosités. De même que sur gélatine, le diamètre de ces corpuscules est un peu plus petit que dans les nodosités, leurs formes sont moins souvent ramifiées, et il y a prédominance des états de bactérium et de bacille.

Mes cultures ne m'ont jamais offert que des organismes dépourvus de tout mouvement propre. Je n'ai pas eu l'occasion d'observer les bâtonnets mobiles d'un très petit diamètre (0,2 μ environ) signalés par M. Beyerinck [2] et M. Prazmowski [3]. La petitesse de ces éléments m'a probablement empêché de les distinguer.

Avant de continuer l'exposé des propriétés physiologiques

1. *Comptes rendus*, t. CXI, p. 926.
2. Loc. cit. p. 758.
3. Loc. cit. t. XXXVII, p. 202.

du *Rhizobium*, le moment est venu de discuter la place à lui accorder dans la classification.

Le Rhizobium n'est pas une bactérie proprement dite. L'idée de considérer le microbe des nodosités comme une bactérie s'imposait naturellement à l'esprit des premiers naturalistes qui observèrent les bactéroïdes. On n'en connaissait ni l'origine, ni le mode de reproduction, et l'on ne pouvait présumer que la similitude n'était qu'apparente. Aujourd'hui nous savons que les bactéroïdes naissent par bourgeonnement des filaments mycéliens, et que c'est encore par le même procédé qu'a lieu leur reproduction. Chez les bactéries typiques, celle-ci se fait par division transversale.

Le bourgeonnement des bactéroïdes suffirait à leur assurer une certaine parenté avec les champignons inférieurs du groupe des Levures et des formes-levures. Ce rapprochement s'impose, si l'on tient compte de l'existence constante dans les nodosités des filaments mycéliens. Longtemps, on n'en avait pas vu les membranes cellulosiques; mais ce caractère est devenu tout à fait certain à la suite des observations faites par M. Vuillemin, M. Pichi, et plus récemment par M. Koch.

Il faut donc abandonner la parenté du *Rhizobium* et des Myxomycètes.

Tout un groupe de champignons filamenteux présentent avec cet organisme plusieurs caractères communs. Ce sont les Ustilaginées, parasites également entophytes, dont plusieurs pénètrent par les racines dans les végétaux supérieurs; presque toutes, comme l'a montré M. Brefeld, produisent des formes-levures; d'autre part, la formation des spores chez ces champignons n'est pas sans analogie avec celle des kystes arrondis qui persistent après la décomposition des nodosités.

L'affinité du *Rhizobium* et des Ustilaginées a été signalée déjà par M. Marshall Ward (*loc. cit.*, p. 549). Et c'est à mon avis, une opinion tout à fait justifiée.

Assurément, les Ustilaginées sont, avec les Hyphomycètes, les champignons à thalle cloisonné les plus inférieurs, si l'on veut bien faire abstraction des états plus élevés auxquels beaucoup de mucédinées ont pu être rapportées.

J'ai hâte de faire remarquer qu'il est un caractère, d'importance peut-être assez relative, qui rapproche le *Rhizobium*

des Bactéries. Ce sont les corps ovoïdes, signalés surtout par M. Beyerinck, et qui apparaissent dans l'intérieur des bactéroïdes. Je les ai rencontrés, assez rarement, il est vrai, aussi bien dans les nodosités que dans les cultures en milieux artificiels. Il est difficile d'admettre que ce ne soient que des globules huileux, ainsi qu'on l'a affirmé. Bien que la germination n'en ait pas été observée, il est permis de croire que ce sont là des spores endogènes analogues à celles des bactéries typiques.

Il existe un organisme qui présente également avec le *Rhizobium* une grande analogie. Je fais allusion au *Pasteuria ramosa* décrit dans ces *Annales* (t. II, p. 165), par M. Metchnikoff. C'est cet éminent naturaliste qui a bien voulu me signaler la ressemblance entre les bactéroïdes et le *Pasteuria*. Pendant l'été dernier, il avait étudié, en Russie, un grand nombre de tubercules de racines de légumineuses, et avait été frappé du mode de ramification des bactéroïdes.

Je dois aussi à la bienveillance de M. Metchnikoff le dessin de la figure 14 (pl. II), qui, comparée aux divers aspects du *Pasteuria*, établit la grande ressemblance entre cette espèce et les formes ramifiées du *Rhizobium*.

Je saisis cette occasion pour remercier publiquement M. Metchnikoff de l'intérêt qu'il a témoigné à mes recherches actuelles.

Les lecteurs de ces *Annales* se le rappellent, le *Pasteuria ramosa* vit dans les Daphnies, se ramifie par division longitudinale qui aboutit à la production de groupes analogues à certains bactéroïdes ramifiés. Il se forme également des spores endogènes. Les ramuscules du *Pasteuria* sont représentés chez le *Rhizobium* par les filaments qui pénètrent l'écorce et se ramifient dans le parenchyme. Enfin, le bourgeonnement des bactéroïdes est souvent dichotomique, et est accompagné alors d'une division longitudinale de la cellule en voie de croissance. Lorsque l'une des deux ramifications prend une direction perpendiculaire à l'autre, il se produit un bactéroïde en forme de T; dans le cas contraire, ce sont des bactéroïdes en Y qui apparaissent, parfois même des figures dichotomiques plus ramifiées.

J'estime avec M. Metchnikoff que ces caractères permettent de réunir en un même groupe le *Rhizobium* et le *Pasteuria*, et ce groupe est, à mon avis, intermédiaire entre les bactéries authen-

tiques et les champignons filamenteux les plus inférieurs (Ustilaginées, Hyphomycètes et Levures) [1].

IV

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DU RHIZOBIUM.

Non seulement le *Rhizobium* pénètre dans les racines par des filaments perpendiculaires à l'épiderme, mais il peut aussi s'y développer dans la direction longitudinale, et porter l'infection de proche en proche. Chaque nodosité d'une même racine n'est donc pas due à un germe différent. Voici le procédé qui m'a permis de me convaincre de ce fait.

Dans deux éprouvettes cylindriques, je fis entrer avec force un bouchon de liège assez épais; il partageait chaque vase en deux compartiments dont le supérieur était clos par un autre bouchon coupé en deux. Le premier était percé d'un trou central dans lequel j'introduisis l'extrémité d'une jeune racine de pois, et que je fermai avec du coton stérilisé. La solution nutritive ne remplissait pas complètement le compartiment inférieur. La culture fut entourée de toutes les précautions décrites au § II, et l'inoculation fut faite sur la portion de racine située au-dessus du bouchon. Il y avait donc des

1. Dans ma note préliminaire, j'ai proposé de désigner cette nouvelle famille de microbes sous le nom de *Pasteuriacées*. En agissant de la sorte, je n'obéis pas seulement aux lois de la nomenclature botanique, mais me réjouis d'honorer le nom du savant illustre, qui a donné aux études microbiologiques une impulsion si féconde.

La famille des Pasteuriacées comprend actuellement deux genres, l'un parasite des Daphnies, l'autre vivant en symbiose avec les Légumineuses. Chez le *Pasteuria*, il y a prédominance de la division longitudinale, tandis que chez le *Rhizobium*, des filaments produisent des bourgeons souvent réunis sur des sortes de capitules; on observe fréquemment l'existence de bourgeons dichotomiques entre lesquels se fait d'abord un commencement de division longitudinale.

Les naturalistes respectent autant que faire se peut la première dénomination donnée à un être vivant. Quelques explications sont nécessaires afin de motiver le nom que j'ai adopté pour le microbe des nodosités. Le genre *Schinzia* comprend aujourd'hui des espèces assez différentes de ce microbe. Au reste, c'est l'auteur lui-même, M. Frank, qui a créé le nom de *Rhizobium leguminosarum* pour la bactérie en forme de *Micrococcus* dont il admet la présence dans les tubercules des Légumineuses. Tout en conservant cette dénomination, j'attribue au microbe en question des caractères tout différents.

Quant au genre *Cladochytrium* dû à M. Vuillemin, il est fondé sur des organes zoospores) dont l'existence est très problématique. Ils ont été observés dans des tubercules récoltés après l'hiver, sans doute envahis par des organismes étrangers.

Enfin, la désignation adoptée par M. Beyerinck, *Bacillus radicicola*, ne peut pas non plus être conservée pour un microbe nettement différent des bactéries authentiques.

racines qui croissaient dans l'air maintenu humide au moyen d'un peu de papier à filtrer imbibé d'eau stérilisée; d'autres plongeaient dans le liquide de culture.

Les nodosités se sont formées d'abord dans l'air humide et quelque temps après dans l'eau, surtout au voisinage de la cloison séparatrice. Des filaments mycéliens avaient donc dû croître dans la direction des faisceaux libéro-ligneux, à la façon des mycéliums des *Ustilago* qui vivent dans les tiges de diverses graminées.

Ces deux cultures m'ont mis à même de constater avec certitude que la production des bactéroïdes dépend de l'aération du milieu qui entoure les tubercules. Plusieurs observateurs avaient mis en doute la fixation de l'azote aérien par les légumineuses cultivées dans les solutions nourricières. Cependant M. Bréal [1] et plus récemment M. Prazmowski [2] ont obtenu avec des pois des gains d'azote très notables. La divergence des résultats s'explique, à mon avis, par les conditions d'aération des racines.

A plusieurs reprises, j'ai examiné au microscope des tubercules de pois dont les racines n'avaient jamais cessé de plonger dans l'eau. Bien qu'elles fussent arrivées à l'état adulte, elles ne contenaient pas ou presque pas de bactéroïdes, mais étaient bourrées d'une grande quantité de grains d'amidon, dont la plupart se coloraient en rouge brique par l'iode, comme du glycogène. On a signalé plusieurs variétés d'amidon qui ont la même propriété.

Au contraire, les nodosités formées sur les portions de racines situées hors de l'eau ne m'ont pas présenté d'amidon rougi par l'iode, et contenaient invariablement de grandes quantités de bactéroïdes, à un stade suffisamment avancé de leur développement.

Ce n'est pas tout. Les pois avec tubercules insuffisamment aérés ne fixent que des quantités insignifiantes d'azote libre, restent malingres, donnent peu de fleurs et tout au plus une seule graine. Ils étaient aussi misérables que leur congénères de la même variété cultivés à l'abri de tout microbe.

Au contraire, les pieds dont les nodosités plongeaient dans l'air humide, ont donné plus de feuilles, de fleurs et presque toujours plusieurs graines. C'est là un résultat très satisfaisant,

1. *Annales agronomiques*, t. XV.
2. *Die landwirtsch. Versuchs-Stationen*, t. XXXVIII, p. 46.

car le Pois nain de Grâce donne rarement dans les jardins plus de quatre ou cinq gousses.

Les deux pois de la page précédente, dont la majorité des nodosités avaient été maintenues tout le temps dans l'air humide, renfermaient à la fin de leur végétation 31,3 mgr. d'azote; les deux graines originelles en contenaient 19 mgr.

M. Bréal (*loc. cit.*, p. 536) a déjà attiré l'attention sur l'influence de l'air sur la fixation d'azote. La rareté des bactéroïdes dans les tubercules mal aérés fait supposer que leur apparition est concomitante de l'assimilation de l'azote aérien.

Dans les nodosités qui renferment beaucoup de bactéroïdes, l'amidon finit constamment par disparaître. Il est utilisé pour la formation de substances albuminoïdes aux dépens des produits de l'assimilation de l'azote aérien.

Ce que deviennent les nodosités. — Les bactéroïdes formés dans les tubercules n'ont d'ordinaire qu'une durée assez courte. Les auteurs qui avaient été portés à leur refuser toute autonomie (M. Brunchorst, M. Tschirch), avaient signalé la disparition plus ou moins complète de ces corpuscules, et s'étaient fondés sur ce fait pour les considérer comme des réserves de nature protéique. Ce sont, en effet, des réserves, mais qui dérivent de l'activité d'un organisme étranger, et qui servent à la nutrition de la légumineuse.

La digestion des bactéroïdes est vraisemblablement due à une zymase ou diastase, qui finit par les transformer en combinaisons solubles. Une telle hypothèse nous expliquerait la diminution et finalement la perte de vitalité, constatée d'abord par M. Beyerinck, et que j'ai vérifiées bien souvent dans le cours de ces recherches. Il suffit d'employer un tubercule cueilli sur un pois ou une fève en fleurs ou en fruits pour rendre le succès de l'inoculation très aléatoire; souvent même, on ne voit apparaître aucune nodosité.

Après la digestion des bactéroïdes, beaucoup de tubercules présentent une cavité centrale; le plus souvent, ils sont bientôt la proie des microbes banaux du sol et ils entrent en putréfaction.

J'ai étudié attentivement des nodosités, les unes encore pleines, les autres déjà creuses, envahies ou non par la pourriture; partie provenaient de Pois cultivés dans l'eau, partie de

Fèves et de Pois semés en pleine terre et arrivés au terme de leur végétation. Dans tous ces tubercules, j'ai observé des corpuscules arrondis, le plus souvent ovoïdes, de taille assez inégale (5 à 10 μ) et enveloppés par une mince membrane. L'iode les colore en jaune ; ils absorbent vivement le violet dahlia. Je les considère comme des sortes de kystes provenant des filaments mycéliens en grande partie résorbés ; j'en ai vu (Pl. II, fig. 13) en relation avec des restes de ces filaments. Parfois, ces kystes ont leur surface légèrement mamelonnée comme les renflements producteurs des bactéroïdes, ce qui me fait supposer que ceux-ci participent à leur constitution.

A côté de ces renflements, on trouve assez souvent des productions arrondies, souvent groupées par trois ou même quatre, et dont la surface est lisse. Par leur forme, ces masses ressemblent à celles qui ont leur surface mamelonnée et qui donnent les bactéroïdes ; d'après M. Ward, elles pourraient prendre le même aspect. On peut donc admettre que les unes et les autres concourent à la formation des kystes dans les tubercules.

Les kystes résistent à la putréfaction des tubercules. et on les retrouve sans difficulté au milieu des restes cellulaires envahis par les bactéries banales. Je n'ai pu observer la germination de ces germes. Les insuccès des inoculations avec les nodosités trop avancées font supposer qu'ils doivent passer un certain temps à l'état de repos au sein de la terre. Et leur germination pourrait bien être déterminée par des actions chimiotaxiques provoquées par les poils radicaux des Légumineuses.

Influence de la chaleur. — Sur gélatine et dans les bouillons de pois ou de lupin, la race de *Rhizobium* que j'ai cultivée se développe le mieux aux températures comprises entre 22° et 26° ; elle ne croît plus à 30° ; à 10° la croissance des colonies est encore assez vigoureuse.

Cependant, des Fèves et des Pois cultivés à une température voisine de celle-ci (semis faits en pleine terre à la fin de septembre et au commencement d'octobre), ne donnent guère de nodosités radicales. Il en est de même des pois cultivés en hiver dans des serres suffisamment chauffées. La cause de cet arrêt dans le développement du *Rhizobium* ne doit pas être recherchée dans la température ambiante, mais dans la diminution de la fonction d'assimilation du carbone. On sait, en effet, que tout ce

qui nuit à celle-ci diminue l'aptitude à produire des tubercules, parce que le *Rhizobium* emprunte des aliments hydrocarbonés à la plante hospitalière.

Plusieurs savants (MM. Hellriegel, Beyerinck, Prazmowski) ont indiqué que les germes du microbe des nodosités sont tués par un chauffage à 60°, 70° ou 75°. Des nodosités en voie de croissance et intactes, doivent être chauffées dans l'eau à 90° ou 95° pendant cinq minutes pour perdre leur pouvoir d'infection sur racine de pois. On abaisse notablement le chiffre de ces degrés de résistance, quand on assure la rapide pénétration de la chaleur en chauffant de petites ampoules de verre remplies de liquide de cultures pures : le chauffage a été fait dans l'eau et a duré cinq minutes. Le microbe a résisté à 50°, mais a été tué à 55°, même lorsqu'il était emprunté à d'anciennes cultures. Dans celles-ci, il y avait çà et là des corps brillants en forme de spores à l'intérieur des bactéroïdes. Leur résistance est donc très limitée ; mais cet argument ne suffit pas pour leur refuser la qualité de spores.

Lorsque je faisais des essais de chauffage avec des nodosités, j'ai remarqué que celles qui avaient été portées à 56° et 62° provoquaient chez le Pois l'apparition de tubercules plus nombreux que dans les cultures faites sans chauffage de la semence. J'attribue ce résultat à l'excitation que la chaleur avait communiquée au microbe.

Influence du temps. — Des cultures de *Rhizobium*, faites en juin 1889 dans du bouillon de poule, et conservées jusqu'au mois d'octobre 1890, c'est-à-dire pendant 15 mois, ont été ensemencées sans succès.

Influence des nitrates. — L'addition de 1/500 ou de 1/1000 de nitrate de potassium ou de sodium aux bouillons de pois ou de lupin les rend presque stériles pour le *Rhizobium*. Il n'en est nullement ainsi dans les milieux minéraux additionnés de sucre dont il sera bientôt question, et dans les bouillons de pois et de lupin gélatinisés.

Ces résultats permettent de supposer qu'il existe dans le Pois et le Lupin une substance qui, en présence des nitrates, paralyse le développement du *Rhizobium*, substance dont la gélatine empêcherait la diffusion rapide.

Culture du Rhizobium dans les solutions minérales avec ou sans azote. — Influence de substances diverses. — Les premières cultures de *Rhizobium* en solutions minérales avec ou sans azote, ont été faites par M. Prazmowski [1]. Sans connaître les résultats obtenus par ce savant, j'avais entrepris des essais analogues, dont il a déjà été question dans ma note des Comptes rendus du 17 novembre. Comme M. Prazmowski, j'ai vu le microbe des nodosités végéter dans des solutions privées d'azote; bien qu'aucune estimation précise de l'azote libre fixé dans ces conditions n'ait été faite, l'assimilation de ce gaz par le *Rhizobium* est extrêmement probable.

Tout récemment, M. Frank [2] et M. Beyerinck [3], ont annoncé également avoir fait des cultures dans des solutions minérales avec ou sans azote.

Le milieu que j'ai employé est de l'eau distillée privée de combinaisons azotées, et additionnée de phosphate de potassium à 1 $^0/_{00}$ et de sulfate de magnésium à 0,1 $^0/_{00}$.

Les cultures que l'on obtient sont assez prospères si l'on ajoute à ce mélange 1 $^0/_{00}$ d'asparagine, 1 à 10 $^0/_0$ de peptone, un peu de fibrine du sang, d'albumine de l'œuf, ou de caséine. A la température de 24°, le liquide se trouble bientôt et produit une membrane visqueuse collée au fond du vase. Mais le développement est plus actif, et très appréciable après trois ou quatre jours, lorsqu'on ajoute une substance sucrée à l'un des mélanges que je viens d'indiquer. Le dépôt s'accentue progressivement pendant plusieurs semaines.

Comme on le voit, les substances organiques azotées peuvent suffire à la nutrition du *Rhizobium*, mais il préfère l'association de ces aliments avec une matière hydrocarbonée assimilable.

La suppression de l'aliment azoté n'empêche pas du tout le développement de cet organisme, tandis que dans les mêmes conditions les bactéries banales poussent peu ou mal.

J'ai fait de nombreuses cultures dans la solution minérale à laquelle j'ajouterais 5 à 10 $^0/_{00}$ de saccharose, de maltose, de lactose, de dextrose, de mannite et de glycérine. Ces produits

1. *Die Wurzelknöllchen der Erbse*, p. 201, 1890.
2. *Berichte der deut. Botan. Gesellschaft*, séance du 28 novembre 1890.
3. *Botan. Zeitung*, 1890, n° 52 (26 décembre 1890).

étaient très purs; les sucres avaient été purifiés avec soin en vue de recherches spéciales.

La saccharose m'a paru convenir particulièrement au *Rhizobium;* les bactéroïdes qui s'en nourrissent sont plus gros, plus réguliers, moins ramifiés que ceux qui avaient végété sur bouillon de pois gélatinisé.

Le dépôt visqueux ne s'est pas formé au fond des vases de

Fig. 3. — Gross. 1,000.

a, Bactéroïdes de pois cultivés sur bouillon de pois gélatinisé.
b, Bactéroïdes de pois cultivés dans la solution minérale sans azote et avec saccharose.
c, Bactéroïdes de pois cultivés dans la solution minérale avec fibrine.

culture lorsque le liquide nutritif a une épaisseur de plus de 5 millimètres; avec une couche d'un centimètre d'épaisseur, il s'est produit seulement des flocons qui flottaient dans le liquide; enfin, dans les liquides plus profonds, j'ai observé un trouble, mais pas de dépôt.

Dans les bouillons de pois et de lupins, le manque d'air se fait moins sentir, et l'on obtient un dépôt assez abondant sous des couches liquides de trois ou quatre centimètres d'épaisseur.

Il semble donc que l'action de l'air soit surtout nécessaire dans les mélanges privés d'azote combiné. A propos des cultures des pois dans les solutions sans azote, j'ai signalé la même exigence. Ces deux remarques portent à croire que l'air n'est pas seulement indispensable comme source d'oxygène, mais aussi comme source d'azote dans les milieux auxquels cet élément fait défaut.

L'expérience suivante me paraît prouver l'exactitude de cette présomption.

Au fond de deux petits matras coniques, j'avais introduit du bouillon de lupin gélatinisé, qui après stérilisation fut ensemencé avec du *Rhizobium*. L'air des matras fut chassé par un courant,

prolongé pendant un quart d'heure, d'azote préparé au moyen de cuivre chauffé au rouge. Après fermeture hermétique, les deux récipients furent retournés sous l'eau. Des colonies larges d'environ trois millimètres se sont développées sur la gélatine nutritive ; bien que plus réduites que d'autres laissées à l'air ordinaire, elles attestent que dans l'azote pur le *Rhizobium* peut continuer à croître pendant quelque temps.

Le microbe est donc un organisme aérobie, qui, dans les milieux privés de combinaisons azotées, exige le concours de l'azote plus que celui de l'oxygène.

J'ai commencé à étudier l'action de diverses substances minérales ou organiques. A la dose, de 1 $^0/_{00}$ les sulfates de zinc, de cuivre, d'alumine, de fer, le chlorure de sodium, l'acide tartrique, le tartrate de potassium et l'urée empêchent le développement du *Rhizobium* dans la solution minérale avec 1 $^0/_{00}$ de saccharose.

Le sulfate d'ammoniaque et la potasse à 1 $^0/_{00}$ ne sont pas nuisibles ; ce sont donc les milieux neutres ou légèrement alcalins qui sont les plus convenables. Et, en effet, j'ai constaté que les colonies développées sur gélatine sont toujours bien neutres. Dans les diverses décoctions végétales naturellement acides (carotte, navet, chou, pomme de terre, chou-fleur), ainsi que dans l'eau de levure, dans le liquide Raulin, aucune croissance n'a été remarquée.

Lorsque ces mêmes liquides sont gélatinisés et neutralisés, ils conviennent parfaitement à la culture du microbe ; j'en ai obtenu de très grandes colonies sur bouillon de carotte ainsi préparé.

Enfin, je me suis proposé de rechercher si chacun des éléments minéraux composant la solution nutritive (soufre, phosphore, potassium et magnésium), est indispensable à la végétation du *Rhizobium*. J'ai préparé des mélanges auxquels l'un de ces corps simples faisait défaut ; après ensemencement ils sont restés vierges de toute végétation, à l'exception de celui qui était privé de soufre et dans lequel un faible dépôt s'est formé, grâce sans doute à l'existence d'un peu de soufre dans le sucre employé.

Il ne suffit pas de cultiver un organisme dans des milieux minéraux privés d'azote pour démontrer l'assimilation de l'azote

libre : des indications numériques fournies par l'analyse sont de toute nécessité pour emporter les convictions. Pour obtenir un gain d'azote sensible, il convient de disposer de dépôts de cultures assez considérables ; l'obligation de ne donner à celle-ci qu'une très faible épaisseur exige l'emploi de matras à fond plat d'un très grand diamètre, et dont le col serait étiré et fermé pour éviter l'influence des combinaisons azotées de l'atmosphère. Une première série d'essais réunissant ces conditions n'a pas donné des résultats assez concluants. J'espère les répéter bientôt avec plus de succès.

En attendant, et en considérant comme permis d'attribuer au *Rhizobium* la propriété d'assimiler l'azote libre de l'air, la biologie de cet organisme peut être résumée comme suit :

Les germes du *Rhizobium* mélangés à la terre arable se développent au contact des poils radicaux des Légumineuses, y pénètrent à l'état de filament, et donnent lieu à un développement cellulaire anormal. Lorsqu'il assimile l'azote de l'air, le mycélium produit par bourgeonnement une infinité de corpuscules, les bactéroïdes, riches en matière albuminoïde. Plus tard, ces corpuscules se dissolvent et sont utilisés par la plante hospitalière pour sa propre nutrition. Quant au microbe, il se conserve soit par des spores nées dans les bactéroïdes, soit par des kystes qui persistent après la résorption des filaments mycéliens. Ces germes finissent par se mélanger à la terre par suite de la pourriture des tubercules.

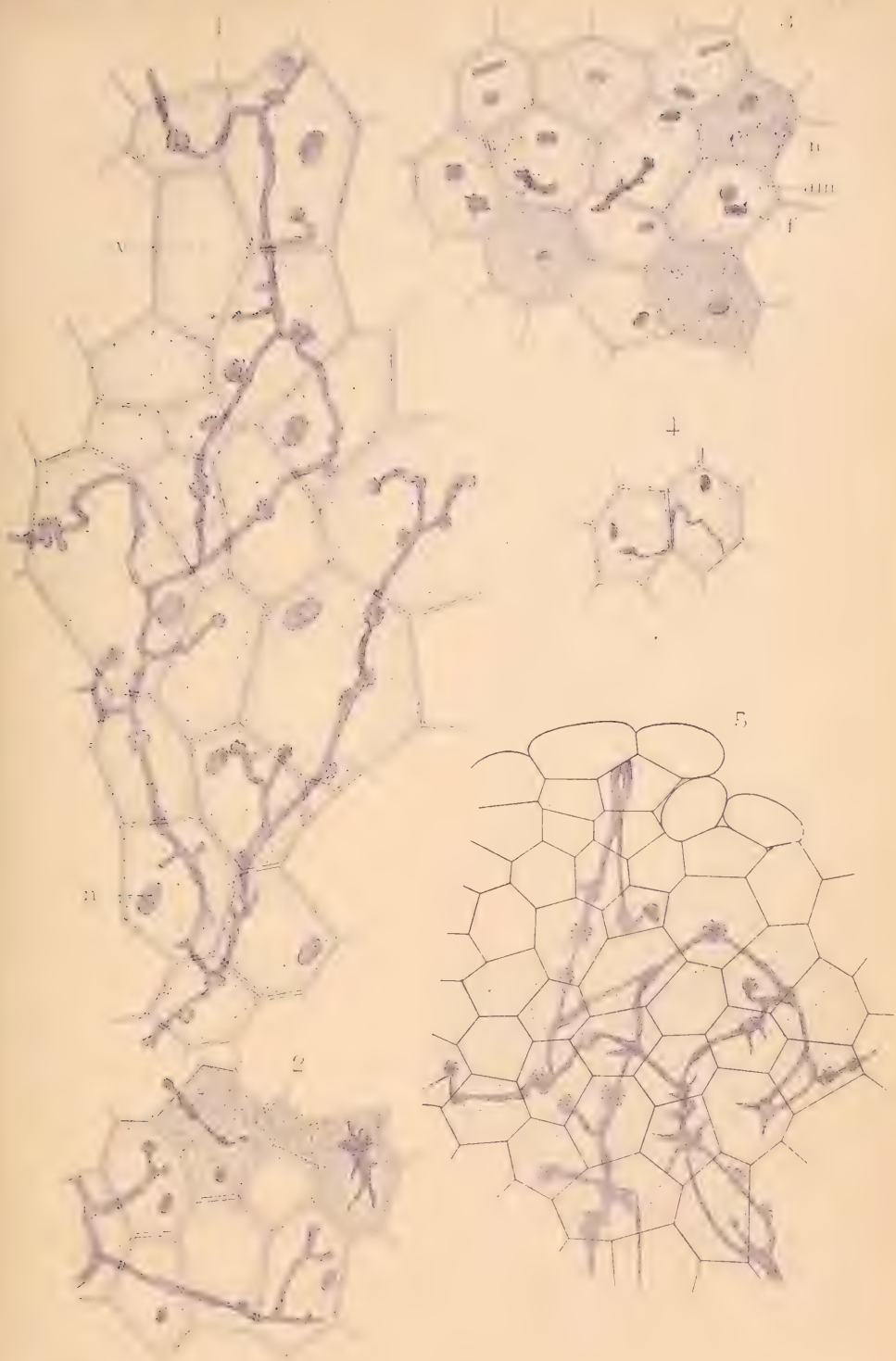
EXPLICATION DES PLANCHES.

PLANCHE I

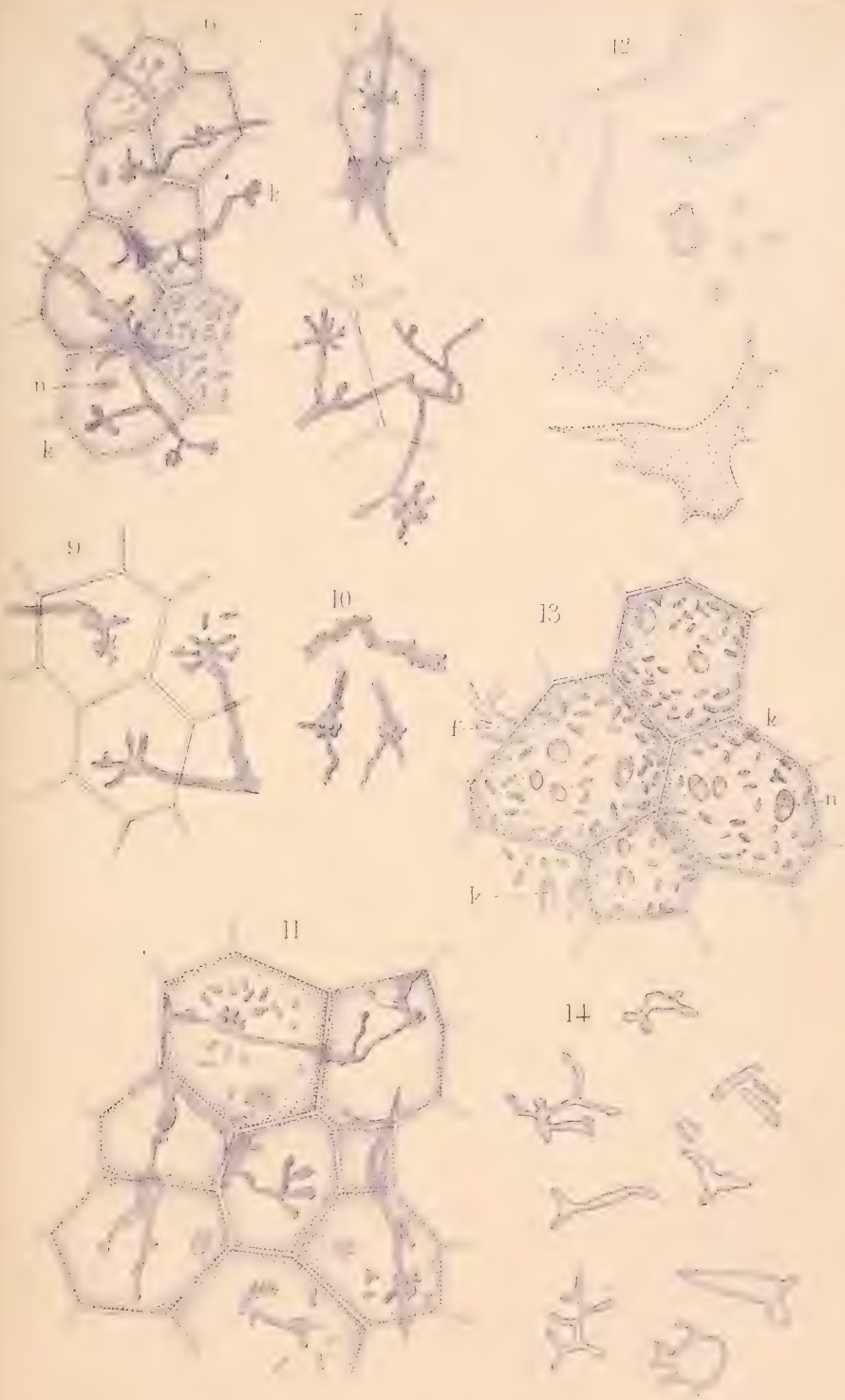
Fig. 1. — Fragment d'une coupe d'un jeune tubercule de Fève cultivée dans l'eau, montrant les filaments du *Rhizobium* avec leurs renflements mamelonnés, *n*, noyau, *v*, vacuoles. Gross. 700.

Fig. 2. — Fragment d'une coupe de nodosité de Haricot d'Espagne ; les filaments sont bien visibles dans les cellules du bas, tandis que dans celles du haut, remplies de bactéroïdes, les filaments sont en voie de résorption. Gross. 700.

Fig. 3. — Fragment d'une coupe de nodosité de Lupin jaune dans



E. Oberlin lith.



E. Laurent. del.

E. Oberlin. lith.

Imp. A. Lafontaine & fils, 150, B^d du Montparnasse.

laquelle il ne reste plus que des tronçons de filaments mycéliens *f.*, restes de filaments mycéliens; *n.*, noyau; *am.*, grains d'amidon. Gross 400.

Fig. 4. — Deux cellules très jeunes d'un tubercule de Lupin jaune avec filament mycélien très fin. Gross. 700.

Fig. 5. — Portion d'une coupe d'une jeune nodosité de Pois, inoculé avec nodosité de Lupin tricolore, montrant des filaments anastomosés. Gross. 300. Les cellules pointillées appartiennent au parenchyme à bactéroïdes, les autres à l'écorce.

PLANCHE II

Fig. 6. — Fragment d'une coupe de tubercule de la Gesse cultivée, dans lequel on voit des filaments qui portent des bactéroïdes; *n.*, noyau, *k.*, masses ovoïdes à surface lisse qui deviendront des kystes. Gross. 500.

Fig. 7 et 8. — Cellules d'un tubercule de Gesse cultivée, avec filaments qui portent des bactéroïdes. Gross. 700.

Fig. 9. — Cellules d'une nodosité de *Galega officinalis*. Gross. 700.

Fig. 10. — Morceaux de filaments mycéliens de *Rhizobium* observés dans les cellules de la même espèce. Gross. 700.

Fig. 11. — Cellules d'un tubercule de Pois dans lesquelles les filaments du *Rhizobium* portent des bactéroïdes. La cellule centrale renferme quatre corps ovoïdes, nés en grappe et à surface lisse. Gross. 700.

Fig. 12. — Diverses formes de colonies de bactéroïdes cultivés sur bouillon de pois gélatinisé, et observées après huit jours. Gross. 150.

Fig. 13. — Cellules d'une vieille nodosité de Fève, dont le contenu est en voie de résorption, et qui renferment des corpuscules brillants (kystes) : *f.*, restes de filaments ; *n.*, noyau ; *k.*, kystes. Gross. 700.

Fig. 14. — Diverses formes de bactéroïdes cultivées en solution minérale additionnée de 1 % de saccharose et de 1 ‰ de peptone. Gross. 1500 Dessin fait par M. Metchnikoff.

Toutes les coupes dessinées avaient été colorées avec le violet dahlia.

REVUES ET ANALYSES

C. Fraenkel. Vaccination contre la diphtérie. *Berl. Klin. Woch.* (1890, n° 49.)

Ce travail fait suite aux *Recherches sur le poison de la diphtérie*, de MM. Brieger et Fraenkel, dont nous avons déjà parlé dans ce recueil. (V. t. IV, p. 380.) M. Fraenkel y cherche un moyen de vaccination contre la diphtérie. On peut affirmer *a priori* que le problème n'est pas facile à résoudre. Avec ces microbes producteurs de toxines énergiques, la question de vaccination est par excellence une question de mithridatisme, et par là, la question de doses entre en jeu. On s'explique tant bien que mal qu'un microbe puisse être empêché de se développer dans l'organisme, et réduit ainsi à l'impuissance. Mais pour les microbes qui peuvent vivre en quelque sorte à la surface de l'organisme comme le bacille diphtéritique, ou qui leur restent extérieurs, tout en vivant dans son intérieur, comme le bacille du choléra, on ne voit pas bien comment on pourrait arriver à protéger un être vivant contre leur atteinte, lorsqu'ils agissent surtout par le poison qu'ils sécrètent. Le mithridatisme pourra être une protection contre un faible développement du bacille cholérique dans l'intestin, et devenir impuissant contre un développement plus abondant. De même une vaccination efficace contre une inoculation du bacille diphtérique sous la peau pourra n'avoir aucun succès contre l'inoculation du même bacille sur une muqueuse.

Ces restrictions faites, il n'en est pas moins intéressant de trouver un moyen de vaccination contre l'inoculation sous-cutanée du bacille de Klebs. M. Fraenkel y est arrivé après plusieurs tentatives dont il est bon de dire un mot, car dans une voie si neuve les insuccès eux-mêmes apprennent quelque chose.

Des deux grandes méthodes de vaccination sorties des travaux de Pasteur, celle par des microbes atténués, et celle par des produits solubles, M. Fraenkel a d'abord étudié la première. Il ne lui a pas été difficile d'obtenir une atténuation temporaire du bacille de la diphtérie, en ajoutant aux milieux de culture un antiseptique tel que le bichromate de potasse ou le violet de gentiane. Mais cette atténuation n'était pas persistante, et les cultures revenaient presque de suite

à leur virulence originelle. Les animaux inoculés mouraient, quelquefois avec des retards notables, de plusieurs semaines, et même de mois, et quand, après avoir attendu assez longtemps pour qu'on pût croire que les survivants étaient à l'abri des atteintes du vaccin, on les inoculait avec le bacille non atténué, ils mouraient aussi rapidement que les animaux de contrôle.

L'atténuation naturelle, sur des milieux de culture médiocre, a donné les mêmes résultats que l'atténuation artificielle par les antiseptiques.

Restait alors à essayer au moyen des produits solubles. M. Fraenkel n'a rien obtenu avec les préparations de poison diphtéritique qu'il avait faites avec M. Brieger. Ou bien la dose inoculée était assez forte pour tuer l'animal, ou bien, quand elle le laissait vivre, elle ne produisait aucun effet, et l'animal, inoculé avec le virus actif, semblait même mourir plus vite que l'animal de contrôle.

Le succès a été un peu plus encourageant quand on a inoculé des liquides de culture stérilisés par un passage à travers un filtre Chamberland ou un chauffage d'une heure à 55°. Parmi les animaux qui avaient résisté à cette inoculation, après une réaction locale plus ou moins marquée, il y en avait qui, inoculés par le bacille virulent, ne succombaient qu'après 3, 4, 6 et même 9 jours, alors que les animaux de contrôle mouraient en 30 et 36 heures. Mais de ce côté-là encore, aucun succès assuré. Le résultat devint meilleur avec des bouillons de culture chauffés à 100°, et désormais dénués de virulence. Des cobayes qui avaient reçu, sous la peau de l'abdomen, 10^{cc} de cette culture stérilisée, pouvaient supporter une inoculation virulente, et le plus grand nombre mouraient après un temps assez long, jusqu'à 20 jours après l'infection.

Enfin il n'y a presque plus rien à désirer quand on se sert comme vaccin d'un liquide de culture chauffé une heure à 65-70°. « Dix à vingt centimètres cubes, suivant la grosseur de l'animal, d'un bouillon de culture de bacilles diphtéritiques, âgé de trois semaines, et traité comme nous venons de le dire, suffisent, lorsqu'ils sont injectés sous la peau de l'abdomen d'un cobaye, à lui conférer l'immunité contre l'inoculation ultérieure du bacille le plus virulent. » Il y a pourtant une condition : c'est que l'inoculation d'épreuve soit faite, au plus tôt, 14 jours après la vaccination. En deçà de cette limite, l'inoculation d'essai est d'autant plus meurtrière que l'on a opéré plus tôt. Mais au delà, on n'a au point d'inoculation du bacille virulent, qu'une réaction locale faible ou nulle. Ajoutons que cette vaccination n'est efficace que contre l'inoculation sous-cutanée du virus, car une femelle vaccinée a succombé à une diphtérie vaginale provoquée par la méthode de Löffler.

Ce procédé de vaccination a ce côté curieux que le liquide de culture, quand il devient vaccinal, n'est presque plus toxique. D'un autre côté, nous avons vu plus haut que le toxique, préparé à un état de pureté aussi grand que possible, n'est pas du tout vaccinal. Il semble donc légitime de conclure que la substance toxique, n'est pas la substance vaccinale. On retrouve là cette notion qui a tant préoccupé la science dans ces dernières années, de la distinction entre les substances vaccinales et les substances toxiques. Il faut toujours accueillir avec honneur une hypothèse qui fait travailler; mais ainsi qu'on pouvait le prévoir, celle ci a été en se subtilisant de plus en plus, car elle correspondait à une conception trop simpliste des choses. Qu'est-ce qu'une substance vaccinante? Le trichlorure d'iode ne l'est pas, dans les expériences de de M. Behring[1] sur la diphtérie. quand on l'injecte quelques jours avant l'inoculation virulente. Il l'est quand on l'injecte en même temps qu'elle ou même après. Pour l'eau oxygénée, c'est l'inverse. Les animaux traités par l'eau oxygénée quelques jours avant l'inoculation virulente ont acquis une immunité plus ou moins marquée. Traités de même à la suite de l'infection, ils meurent plus vite que les témoins. L'eau oxygénée se comporte alors à la façon de l'acide lactique dans le tétanos ou dans l'infection septique, et on a le droit de la traiter de substance toxique après infection, alors qu'avant, elle est un vaccin. Concluons que nous ne savons pas encore grand chose sur ces questions. mais on sent qu'elles sont mûres, et on devine qu'elles seront merveilleusement fécondes.

Dx.

1. *Deutsche med. Woch.*, 1890, n° 50. Nous parlerons de ce travail dès qu'il aura paru *in extenso*.

STATISTIQUE GÉNÉRALE
DE
L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE NAPLES

Dirigé par M. le Professeur CANTANI.

La statistique récemment publiée comprend la période du 22 septembre 1886 à fin janvier 1888, et de juillet 1888 à fin décembre 1890. De février à juillet 1888, l'Institut antirabique de Naples n'a pas fonctionné, faute de ressources, et tous les mordus de la région ont été envoyés à Turin ou à Palerme. On s'explique mal, à distance, les raisons qui ont pu faire couper les vivres à un établissement qui avait rendu des services, et qui en rendra encore de signalés, ainsi que le montrent les chiffres suivants.

Pendant les vingt-deux mois qu'il a fonctionné, l'Institut a reçu 494 mordus, dont 168 mordus par des animaux dont la rage a été démontrée par voie expérimentale, 138 mordus par des animaux reconnus enragés par des caractères cliniques, et 99 par des animaux simplement suspects de rage. Sur ces 494 traités, il en est mort 9, dont 3 enfants gravement mordus à la figure, venus à l'Institut seulement 12, 15 et 18 jours après la morsure, et chez lesquels la rage a éclaté, pour l'un, pendant le traitement, pour les autres 2 et 3 jours après. En les comptant, la mortalité est de 1.82 %; et en les retranchant, comme on en a le droit, puisque sur eux le traitement n'a pas été commencé à temps, la mortalité tombe à 1,21 %. La statistique est signée par MM. les docteurs Zagari et Tedeschi.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de la rage.

Brousse Raymond, 24 ans, cultivateur à Toulenne (Gironde). — Mordu le 16 août 1890 à la main droite, qui porte trois morsures : 1° une sur l'éminence thénar; 2° les 2 autres sur la face externe du poignet. Ces deux dernières ont bien saigné; elles étaient très pénétrantes, les dents de l'animal s'étant rejointes à travers les chairs.

Elles ont été cautérisées au fer rouge par un médecin, trois quarts d'heure après l'accident. Le chien mordeur a été reconnu enragé, à l'autopsie, par M. Sanset, véterinaire à Langon.

Brousse a été traité à l'Institut Pasteur du 20 août au 3 septembre.

Le 13 janvier 1891, Brousse tombe malade; le lendemain, il présente les symptômes de la rage (hydrophobie, etc.); il meurt le 15 janvier dans un accès de rage convulsive.

(Rapport de M. le Dr Bonnefoy, de Langon.)

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — JANVIER 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	»	»	»	»	»	»	»	1
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	»	»	»	»	»	»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	»	»	»	1	»	»
Morsures aux mains — simples	»	9	13	»	16	35	»	1	4
Morsures aux mains — multiples	»	4		1	19		»	3	
Cautérisations efficaces	1	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	13	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	6	»	»	21	»	»	3	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	1	2	»	8	17	»	5	14
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	1		»	9		»	9	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	2	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	9	»	»	9	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	6	»	»	3	»	»
Habits déchirés	1	»	»	16	»	»	14	»	»
Morsures à nu	1	»	»	1	»	»	»	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	4	4		»	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	3	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	2	»	»	»	»	»
Morsures à nu	»	»	»	4	»	»	»	»	»
Totaux — Français et Algériens		13	15		42	56		14	19
Totaux — Etrangers		2			14			5	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					90				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 83 fois; chats, 5 fois; cheval, 1 fois; vache 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. MARS 1891. N° 3

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA VACCINATION CHARBONNEUSE

PAR Mme O. METCHNIKOFF.

I

L'étude de l'immunité en général peut tirer un grand secours de recherches sur l'immunité artificielle, parce qu'on connaît les facteurs de cette immunité; après avoir inoculé les vaccins qui servent à la conférer, on peut, en sacrifiant les animaux à diverses époques, étudier la suite des phénomènes qui accompagnent l'acquisition de l'état réfractaire.

Cette question a déjà été l'objet des recherches suivantes.

MM. Roux et Chamberland [1] constatèrent, dans leur travail sur la vaccination des lapins contre le charbon, que les bactéridies du premier vaccin, injectées dans les veines, disparaissent très promptement du sang; par contre, elles se conservent beaucoup plus longtemps dans la rate, qui donne des cultures encore 12, 24 et 48 heures après l'injection (et même dans un cas après 140 heures). Cette persistance de la bactéridie est attribuée à la présence de spores dans la culture inoculée,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 11, 1887.

car, déjà 4 heures après l'injection, la majorité des bactéridies est englobée dans les cellules de la rate et se colore difficilement. Ainsi les bacilles du vaccin charbonneux ne pullulent pas dans l'organisme, et l'immunité relative qu'ils lui confèrent pourrait être due à l'introduction des produits de leur culture, ou à ceux de leur destruction.

M. Bitter[1] a fait des expériences sur des moutons pour savoir si, à la suite d'une inoculation sous-cutanée du vaccin, il existait une immunité locale plus ou moins étendue ou, au contraire, une immunité générale. Il a aussi étudié la généralisation des vaccins dans l'organisme. Il résulte de ses observations que ces vaccins ne se généralisent pas (il n'a jamais pu obtenir de cultures, ni des organes, ni du sang), mais qu'ils sont détruits au point d'inoculation. Les ensemencements avec la peau et le tissu sous-cutané en ce point ne donnèrent de culture qu'une seule fois sur cinq expériences. Quant aux préparations microscopiques, elles démontraient toujours la présence d'une quantité plus ou moins grande de bacilles presque constamment libres et en voie de dégénérescence; ce n'est que rarement qu'ils étaient englobés dans les cellules, malgré une leucocytose très prononcée au point d'inoculation. Par suite, M. Bitter affirme que la destruction des bacilles n'est pas due aux éléments cellulaires.

Du travail de M. Gamaléia[2] sur les vaccinations charbonneuses, il résulterait que l'immunité contre le charbon n'est conférée qu'à la suite d'une fièvre vaccinale, pendant laquelle les bacilles se propagent du point d'inoculation dans le sang et dans tous les organes; ils y sont détruits, et les débris de leur désagrégation sont ensuite éliminés par les reins dans l'urine. Ces conclusions résultent de l'examen de préparations étalées, colorées par le bleu de méthylène, et d'ensemencements faits avec les organes. Ceux-ci ne donnaient que rarement des cultures, qui ne tuaient jamais les animaux et ne provoquaient même pas de symptômes morbides. Pour M. Gamaléia, la destruction des bacilles ne s'opère que partiellement dans les cellules, notamment dans les macrophages de la rate, de la moelle des os et des autres organes; le plus souvent elle se produit

1. *Zeitschrift für Hygiene*, t. IV, 1888.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 10, 1888.

hors des cellules. M. Gamaléia rattache le mécanisme de cette destruction des bacilles libres aux propriétés acquises des milieux de l'organisme dépourvus de cellules. Il ensemence des spores de bactéridies dans l'humeur aqueuse d'animaux ayant eu une fièvre vaccinale, et comme il n'obtient jamais ainsi de cultures normales, il conclut que le milieu a subi une modification chimique, et que la destruction des bactéridies est principalement due à un changement de même nature dans les milieux de l'organisme de l'animal vacciné. Ce changement serait provoqué par la fièvre vaccinale, pendant laquelle les leucocytes émigrés sécréteraient des produits chimiques, nuisibles au développement des bactéridies.

M. Wyssokovicz [1] se rattache à l'opinion de MM. Roux et Chamberland sur la question de la vaccination par les produits des bacilles. Il croit que les bactéridies ne se propagent point dans l'organisme : il ne les a jamais vues ni dans les organes, ni dans le sang, ni dans l'urine, ni dans la bile. Quant au mode de leur destruction, il affirme que les leucocytes ne prennent jamais part à la lutte contre les microbes. De tous les éléments cellulaires, seules les cellules fixes détruisent les bacilles.

M. Lubarsch [2] a fait des expériences sur des lapins et des moutons. Dans ses essais sur les lapins, il se bornait à chercher ce que deviennent les bacilles introduits sous la peau, ce qui ne se rapporte pas directement au sujet dont nous nous occupons. Sur deux moutons inoculés sous la peau avec des vaccins, M. Lubarsch n'a pas trouvé de généralisation des bacilles. Dans un cas il constata une phagocytose très prononcée au point d'inoculation ; dans l'autre il ne rencontra que peu de phagocytes.

II

Le but principal de ce travail est de rechercher si l'immunité contre le charbon est due à une généralisation des vaccins, et d'étudier la réaction des éléments cellulaires envers eux. Si les bacilles des vaccins ne se propagent pas, il faut admettre avec MM. Roux et Chamberland que la vaccination est due aux produits de la culture injectée ou à ceux de la destruction des

1. *Wratch*, nos 22 et 25, 1888, et *Annales de l'Institut Pasteur*, no 6, 1889.
2. Recherches sur les causes de l'immunité naturelle et acquise, 1891.

bactéridies dans le corps des animaux. S'il y a généralisation, c'est à l'effet direct des bacilles eux-mêmes, ou aux produits qu'ils élaborent dans l'organisme, qu'il faut attribuer la vaccination. D'autre part, si les bactéridies sont extracellulaires dans les organes et au point d'inoculation, et si les ensemencements restent stériles dans les humeurs dépourvues de cellules chez les animaux vaccinés, il faut admettre avec M. Gamaléia l'influence chimique des humeurs dans la destruction des vaccins. Dans le cas où les humeurs ne seraient pas devenues impropres à la culture, c'est surtout à l'activité phagocytaire des cellules qu'on devra attribuer la disparition des bactéridies vaccinales.

Les expériences ont été faites sur des moutons et des lapins. On employait des vaccins pastoriens en cultures dans du bouillon et ayant moins de 24 heures, afin qu'elles ne contiennent ni spores ni formes dégénérées qui auraient pu induire en erreur.

Le contrôle de l'activité des vaccins était fait, avant les inoculations, sur des souris, des cobayes et des lapins[1].

Les moutons que l'on employait pour les expériences étaient des mérinos de la province de Kerson, de la même race que ceux qui ont servi à M. Gamaléia. Il y en a eu dix, dont deux témoins. Tous, excepté un, furent inoculés par 1/8cc du premier vaccin, qui avait tué une souris grise en 30 heures. Quelque temps avant l'inoculation, on prenait la température des moutons deux fois par jour. Elle oscillait entre 39,2 et 40,5.

1er VACCIN. Quatre moutons furent sacrifiés pour les recherches sur le premier vaccin. Comme il est peu probable que la généralisation s'opère dans un temps très court, ce n'est qu'après quinze heures que le premier mouton fut tué. Les autres

1. Les vaccins employés pour les moutons étaient ceux de la station bactériologique d'Odessa, tandis que pour les lapins on avait des vaccins de l'Institut Pasteur. L'effet vaccinal fut prouvé par un nombre considérable de lapins immunisés par les mêmes vaccins, et par la différence notable que présentèrent deux moutons témoins (un vacciné et l'autre non vacciné), vis-à-vis de l'inoculation du virus. Quoique ce dernier, d'origine ancienne, fut trop faible pour tuer le mouton non vacciné, il lui donna une maladie grave et de longue durée avec des températures s'élevant jusqu'à 42,3 (Voir la table des températures). Le témoin vacciné ne ressentit par contre aucun malaise, et ne présenta aucune élévation de température.

le furent après 24, 46 et 70 heures. La température de trois de ces moutons avait subi une certaine élévation (chez l'un d'eux elle était montée de 39,5 à 41,1), chez le quatrième elle était restée normale. (Voir l'*appendice*.)

Comme phénomènes locaux on n'a constaté qu'une légère hypérémie du tissu sous-cutané. Une seule fois, chez le mouton tué après 46 heures, on a trouvé un œdème insignifiant. Tous les organes étaient complètement normaux.

Ils furent ensemencés, ainsi que le sang, l'urine et le tissu sous-cutané au point d'inoculation.

Ce dernier seul donna des cultures de bactéridies et seulement chez les moutons tués 15 et 24 heures après l'inoculation.

Pour définir la virulence de ces cultures, on inocula 1/8 de centimètre cube de celle du mouton, tué après 24 heures, à une souris grise. Elle succomba 5 jours après, avec tous les symptômes caractéristiques du charbon.

Quant aux moutons sacrifiés, les préparations étalées de leurs organes, de leur sang et de leur urine ne montraient, après coloration par le bleu de méthylène ou la méthode de Gram, ni bactéridies normales ou dégénérées ni de leurs débris. Le même fait fut constaté sur les coupes, colorées par la méthode de Gram.

Les préparations faites avec le tissu sous-cutané du point d'inoculation démontrèrent une leucocytose très prononcée ; les bactéridies y étaient en quantité plus ou moins grande. Sur les préparations étalées, faites après 15 et 24 heures, elles étaient fréquemment libres, mais il y en avait aussi dans les microphages qui étaient plus ou moins en voie de dégénérescence.

Sur les coupes du tissu sous-cutané, faites après 46 heures, c'est-à-dire au moment où on a sacrifié l'animal, le tissu est complètement infiltré par des masses de leucocytes, qui ont englobé une quantité de bacilles plus grande que celle que l'on trouvait chez les moutons sacrifiés après 15 et 24 heures. Ce n'est qu'entre les faisceaux connectifs que l'on rencontre des bacilles et des filaments libres.

Les bactéridies dégénérées sont contenues dans les cellules ; elles sont en forme de bâtonnets à bords rongés et en tronçons séparés ou en chapelets ; parfois elles ne se colorent que très mal.

Comme il est facile de suivre tous les stades de dégénérescence depuis le bâtonnet normal jusqu'à ses derniers débris, il

est indubitable que c'est vraiment à des bacilles charbonneux dégénérés que l'on a affaire. et que leur destruction s'opère dans les cellules mêmes. Dans les préparations. faites par les mêmes procédés avec les organes, on ne voit rien de semblable, ce qui prouve que les organes ne contiennent pas en quantité appréciable de bacilles ou de leurs débris.

Pour se rendre compte des changements chimiques, produits dans les humeurs par la fièvre vaccinale qui suit l'inoculation du 1er vaccin. des ensemencements furent faits dans l'humeur aqueuse du mouton qui avait eu une température de 41,1.

Des spores du 2e vaccin (sur fil de soie) germèrent dans ce milieu après 16 à 20 heures. Elles donnèrent des cultures abondantes et tout à fait normales. La dimension des bacilles était celle des bactéridies ordinaires du 2e vaccin, et ils prenaient très bien la matière colorante.

2e VACCIN. On inocula les cinq autres moutons, dont un témoin, avec le 2e vaccin. Le contrôle de la virulence fut fait sur des lapins russes qui, plus petits que les lapins de Paris, sont toujours tués par le 2e vaccin. Ils succombèrent après 60-63 heures, avec tous les symptômes du charbon, et des bactéridies dans le sang.

Des quatre moutons employés pour les recherches sur le 2e vaccin, le premier fut sacrifié après 18 heures ; les autres, après 40, 63 et 87 heures. Ce n'est que chez le mouton tué après 40 heures qu'on a observé une élévation de température notable : 41,7. Chez les autres elle n'avait pas dépassé 39,5 — 39,9.

Les moutons tués après 18 et 40 heures avaient une hypérémie du tissu sous-cutané au point d'inoculation ; chez ceux qui furent sacrifiés plus tard, l'hypérémie était plus prononcée et il y avait en outre un œdème. Dans tous les cas les organes étaient normaux, excepté la rate qui fut trouvée plus molle et plus foncée chez les moutons tués après 63 et 87 heures.

Des ensemencements furent faits avec le sang, l'urine, les organes et le tissu sous-cutané au point d'inoculation.

Seul ce dernier donna dans tous les cas des cultures charbonneuses caractéristiques. Quant aux organes, un seul ensemencement de la rate du mouton tué après 40 heures donna une culture ; tous les autres restèrent stériles ainsi que ceux du sang et de l'urine. Les cultures qui s'étaient développées conte-

naient des bactéridies tout à fait normales dans leur croissance, leur dimension, et dans la façon dont elles se coloraient. Pour définir leur virulence, on les inocula à des lapins. Un huitième de centimètre cube de culture de la rate du mouton (sacrifié après 40 heures) inoculé sous la peau d'un lapin le tua après 47 heures. Le tissu sous-cutané de l'abdomen du lapin était très œdémateux, et le sang contenait une petite quantité de bactéridies caractéristiques.

On peut conclure de cette expérience que les bacilles parvenus dans la rate étaient virulents. C'est pour cela sans doute qu'ils avaient pu échapper à l'action cellulaire au point d'inoculation, et pénétrer jusque dans cet organe.

D'autres lapins furent inoculés avec des cultures obtenues du tissu sous-cutané des moutons tués après 40, 63 et 87 heures.

Les lapins qui reçurent les deux premières cultures (de 40 h. et 63 h.) furent très malades, eurent de gros œdèmes, mais finirent par se rétablir. Le troisième lapin (de 87 h.) succomba après trois jours avec tous les symptômes caractéristiques du charbon et avec une quantité de bacilles dans le sang. Peut-être la virulence de ces cultures était-elle moindre que celle du vaccin inoculé: sur les préparations du tissu cellulaire du point inoculé, on voit que déjà après 40 heures la majorité des bacilles est englobée dans les microphages, et qu'il n'y a que très peu de bactéridies libres et normales : la plupart sont au contraire en voie de dégénérescence et dans l'intérieur des cellules. Les coupes démontrent que tout le tissu au point d'inoculation est infiltré de leucocytes.

Il se peut donc que les bacilles soient affaiblis, quoique encore en état de donner des cultures.

Sur les préparations faites avec les organes, le sang et l'urine, on ne trouvait nulle part de bacilles soit normaux, soit dégénérés. Même sur les coupes faites avec la rate qui avait donné une culture, on n'a pas réussi à en trouver, ce qui prouve que la quantité des bactéridies y était bien petite.

Quant aux expériences sur la germination des spores dans l'humeur aqueuse de l'animal fébricitant, elles donnèrent les mêmes résultats que celles faites avec le 1er vaccin. Des spores du 1er et du 2e vaccin, et aussi du charbon virulent germèrent dans l'humeur aqueuse du mouton qui avait eu une température

de 41,7. Elles se développèrent toutes le lendemain de l'ensemencement. Leur croissance était abondante et caractéristique ; les bactéridies étaient en forme de bâtonnets et de longs filaments tout à fait normaux.

De ce qui précède on peut tirer les conclusions suivantes : Chez les moutons, les deux vaccins provoquent des phénomènes locaux et opèrent leur effet à cause de leur culture locale ; les bactéridies ne pullulent point dans l'organisme, mais sont détruites sur place par les éléments cellulaires, surtout les leucocytes ; la pénétration des bacilles dans les organes est un phénomène rare, ne pouvant avoir par suite d'importance dans la vaccination de l'animal. Enfin les humeurs, dépourvues de cellules, des animaux vaccinés, ne contiennent pas de produits nuisibles au développement des bactéridies.

III

Les résultats des expériences faites sur les lapins [1] concordent en général avec ceux qui viennent d'être exposés.

1er VACCIN. Le mode d'inoculation du premier vaccin est très favorable à l'étude des relations entre les cellules et les bacilles, puisque ces derniers sont introduits directement dans le système sanguin.

On a sacrifié les lapins 30 minutes, 45 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 3 heures 1/2, 4, 6, 24 et 48 heures après l'inoculation. Le sang, l'urine et les organes étaient examinés et ensemencés.

Les bacilles disparaissent très promptement du sang, comme cela a été décrit par MM. Roux et Chamberland. Déjà une demi-heure après l'injection il y en a très peu et, au bout d'une heure, on ne parvient plus à les trouver ni par un examen microscopique, ni par la culture. On n'observe point de bacilles dans l'urine. Déjà une demi-heure après l'injection, on trouve la ma-

1. Les expériences étaient faites sur des lapins français et on employait les vaccins ordinaires.

On inoculait 35cc du 1er vaccin dans la veine de l'oreille. Chez trois des lapins sacrifiés pour les expériences sur le 2e vaccin, on a injecté une quantité plus faible, de 5 à 25cc, parce que le vaccin avait été renforcé. — On inoculait 0,25cc du second sous la peau, 7 jours après la seconde inoculation du 1er vaccin.

jorité des bactéridies englobée dans les microphages principalement, mais aussi dans les macrophages. C'est surtout dans les poumons qu'on trouve une quantité de bacilles; cela s'explique peut-être parce que, étant introduits dans le système veineux, ils parviennent premièrement dans le poumon et y sont retenus en partie. Dans tous les organes, la majorité des bacilles est englobée par les cellules; on rencontre des formes plus ou moins dégénérées, mais il y a encore des bâtonnets libres et complètement normaux. C'est dans les reins que les bacilles sont le moins nombreux; il est exceptionnel d'en rencontrer.

Tous les ensemencements faits avec les organes 45 minutes, 1 et 2 heures après l'inoculation, donnèrent des cultures. Sur les préparations, on pouvait observer les mêmes phénomènes qu'après une demi-heure, avec cette différence que le nombre des bactéridies englobées dans les microphages et macrophages était d'autant plus grand que l'animal avait été sacrifié plus longtemps après l'inoculation; alors la grande majorité des bacilles était dégénérée, il y en avait très peu de libres et normaux.

Déjà, après trois quarts d'heure, les bacilles sont beaucoup plus rares dans les organes que dans la première demi-heure qui suit l'injection.

La virulence des cultures faites avec les organes est éprouvée en inoculant à une souris blanche la culture de la rate d'un lapin, tué une heure après l'inoculation. Elle succomba le 7e jour. Avant de périr, il semble donc que les bacilles du 1er vaccin subissent une diminution dans leur virulence.

Les organes d'un lapin tué après 3 heures servirent à faire des ensemencements multipliés; la rate seule donna une culture, et seulement trois jours après l'ensemencement. Une souris, inoculée par cette culture, résista.

Trois heures et demie après l'inoculation, les ensemencements des organes ne donnèrent plus de cultures. Sur les préparations étalées et sur les coupes, on trouvait tous les bacilles englobés dans les microphages et macrophages et en voie de dégénérescence plus ou moins avancée.

Aucun des ensemencements faits avec les organes d'animaux inoculés depuis plus longtemps, ne donna de cultures. On n'a pu davantage trouver de bactéridies sur les préparations.

Ces expériences prouvent que les bacilles du 1er vaccin ne

pullulent point dans l'organisme, mais y sont détruits par les cellules dans un temps très court, notamment près de 3 heures 1/2 après l'injection.

Deuxième inoculation du 1er vaccin. A quatre lapins, qui avaient déjà reçu le 1er vaccin, on injecta une dose de 35cc du même vaccin, ainsi que cela se pratique quand on veut donner l'immunité à ces animaux. Ils furent sacrifiés 1, 2, 3 et 6 heures après cette seconde inoculation.

Les ensemencements des organes du lapin, tué une heure après l'inoculation, donnèrent tous des cultures normales et caractéristiques; le sang et l'urine restèrent stériles. Sur les coupes on trouvait la majorité des bacilles plus ou moins dégénérés et englobés dans les microphages et macrophages.

De tous les organes du lapin tué après 2 heures, les poumons et les reins fournirent seuls des cultures. Sur les coupes on a pu constater que presque tous les bacilles étaient dégénérés et englobés dans les microphages et macrophages; on n'en trouvait que très rarement de libres.

Le rein du lapin tué 3 heures après l'inoculation fut le seul organe qui donna une culture.

Chez les animaux sacrifiés après 6 heures, tous les organes ensemencés restèrent stériles.

Ainsi on obtient les mêmes résultats avec le 1er vaccin inoculé une deuxième fois; la seule différence consiste, peut-être, en ce que les phénomènes de destruction des bacilles se produisent un peu plus promptement : déjà 2 heures après l'inoculation, une partie seulement des organes donne des cultures. Ce fait peut être expliqué par l'accoutumance partielle de l'organisme au 1er vaccin.

2e vaccin. Pour l'étude des phénomènes produits chez les lapins par le 2e vaccin, on a inoculé ces animaux sous la peau avec 0cc,25 de ce vaccin, 7 jours après qu'ils avaient reçu dans la veine les deux injections préparatoires du 1er vaccin.

Ils ont été sacrifiés à des temps variables après l'inoculation; le premier à partir de la 6e heure, car il n'est pas probable que la généralisation se produise plus tôt. Les vaccins employés tuaient les souris et les cobayes.

Les ensemencements faits avec le sang, l'urine et les organes du lapin tué 6 heures après l'inoculation, restèrent tous stériles. Deux lapins furent tués 12 heures après l'inoculation. Leur sang et leurs organes ne donnèrent point de cultures.

On ensemença le tissu sous-cutané pris au point d'inoculation d'un de ces lapins ; il donna une culture qui fut inoculée à un cobaye. Celui-ci résista.

Les ensemencements faits avec le sang et les organes d'un lapin tué 21 heures après l'inoculation restèrent stériles.

Deux lapins furent sacrifiés après 24 heures. La rate de l'un et le rein de l'autre donnèrent des cultures. On inocula deux cobayes avec la dernière de ces cultures. L'un d'eux résista, l'autre succomba après trois jours, avec les symptômes caractéristiques du charbon. Ainsi on retrouve un affaiblissement de la virulence comme chez le mouton, car les cobayes de contrôle qui recevaient directement le 2e vaccin employé, mouraient au plus tard 40 heures après l'inoculation.

Le sang et les organes de ces deux lapins restèrent stériles. Il en fut de même pour le sang, l'urine et tous les organes du lapin tué 41 heures après l'inoculation.

Chez l'un des deux lapins, tués 42 heures après l'inoculation, le sang, l'urine et tous les organes restèrent stériles; chez l'autre on obtint une culture avec le rein; les autres organes et le sang n'en donnèrent point.

48 heures après l'inoculation, des ensemencements multipliés restèrent stériles.

Ainsi sur les dix expériences faites avec le 2e vaccin chez les lapins, ce n'est que dans trois cas que l'on obtint des cultures tantôt d'un organe, tantôt d'un autre ; encore dans ces cas, sur plusieurs ensemencements, un seul se montrait fécond.

Tout cela démontre que les bacilles du 2e vaccin ne se répandent que rarement en dehors du point d'inoculation.

Quant aux préparations étalées (colorées par la méthode Gram et le bleu de méthylène) du sang, de l'urine et de la pulpe de la rate, des poumons, du foie et des reins, elles ne démontrèrent ni bactéridies normales, ni bactéridies dégénérées, ni leurs débris. L'examen des coupes donna les mêmes résultats.

Les faits, observés dans le courant de ce travail, permettent de tirer les conclusions suivantes :

Les bacilles du vaccin charbonneux produisent leur effet en se cultivant au point d'inoculation, sans se propager nécessairement dans l'organisme ; ils ne pénètrent qu'exceptionnellement et à un faible degré dans les organes. La vaccination est donc due aux produits des bacilles, qui se diffusent du point d'inoculation dans l'organisme.

La destruction des bacilles a lieu au point d'inoculation et s'opère par l'activité phagocytaire des micro- et macrophages.

La vaccination consiste sans doute dans l'accoutumance des éléments cellulaires aux produits toxiques des bacilles.

Cette dernière conclusion est appuyée sur le fait que, chez l'animal vacciné, les vaccins et le virus se développent normalement dans l'humeur aqueuse, dépourvue de cellules, tandis qu'ils sont détruits dans l'organisme où ils deviennent accessibles à l'influence de ces dernières.

APPENDICE

Température des moutons avant les inoculations.

NUMÉROS.	15 AOUT		17 AOUT		18 AOUT	
	10 H. M.	6 H. S.	10 H. M.	6 H. S.	10 H. M.	6 H. S.
1	39.6	40.3	40.0	40.1	39.4	39.6
2.....	39.7	40.0	39.8	40.0	40.0	39.3
3	39.8	40.2	39.8	40.0	39.4	39.5
4..	40.1	40.2	39.9	40.0	40.0	39.2
5.....	39.4	39.5	39.3	39.7	39.3	39.5
6...	39.5	39.9	39.8	40.3	40.0	39.8
7....	39.6	40.0	39.4	39.9	39.9	39.5
8...	39.6	40.4	39.3	39.9	39.7	39.5
9.....	39.9	40.3	39.7	40.1	39.8	39.8
10....	39.3	40.5	39.6	40.1	39.8	39.9

Température des moutons après le premier vaccin.

NUMÉROS.	19 AOUT.		20 AOUT.		21 AOUT.		27 aout.	28 AOUT.		»
	10 H. M.	5 H. S.	10 H. M.	4 H. S.	10 H. M.	4 H. S.	10 H. M.	10 H. M.	5 H. S.	
1.....	39.5	39.7	39.5	39.4	39.1	39.3	39.7	40.1	40.1	»
2.....	39.2	39.7	39.0	39.2	39.1	39.1	38.7	39.3	39.4	»
3.....	39.2	39.9	39.5	39.7	39.4	39.4	39.5	40.5	39.3	»
4.....	39.8	41.1	»	»	»	»	»	»	»	»
5.....	39.4	39.8	39 2	39.2	38.9	39.2	39.3	39.6	39.4	»
6.....	39.7	40.0	39.6	39.6	39 4	39.6	39 0	39.8	39.3	»
7.....	40.6	»	»	»	»	»	»	»	»	»
8.....	39.3	39.8	39.6	39.4	»	»	»	»	»	»
9.....	39.8	39.7	39.2	39.7	39.3	39.4	39.5	39.4	39.9	»
10.....	39.7	39.7	39.4	39.4	39.5	39.6	»	»	»	»

Température des moutons aprés le second vaccin.

NUMÉROS.	29 AOUT.		30 AOUT.		31 AOUT.		1er sept.	7 sept.	»	»
	9 H. M.	11 H. M.	9 H. M.	5 H. S.	9 H. M.	5 H. S.	9 H. M.	9 H. M.		
1.....	38.8	»	41.7	»	»	»	»	»	»	»
2.....	39.5	»	39.0	39·3	39.3	»	»	»	»	»
3.....	»	»	»	»	»	»	39.2	39.2	»	»
5.....	39.4	»	39.7	39.8	39.4	39.7	39.5	39.8	»	»
6.....	39.7	»	39 2	39 9	39.4	39.7	39.5	»	»	»
9.....	39.7	39.5	»	»	»	»	»	»	»	»

Température des témoins aprés l'inoculation du virus.

NUMÉROS.	7 sept.	8 SEPTEMBRE.		9 SEPTEMBRE.		10 SEPTEMBRE.		14 SEPTEMBRE.		16 sept.
	7 H. S.	9 H. M.	5 H. S.	9 H. M.	5 H. S.	8 H. M.	6 H. S.	10 H. M.	5 H. S.	11 H. M
3.....	40.5	41.2	41.9	42.2	42.3	41.8	42.1	41.7	41.1	39.8
5.....	39.5	39.2	39.1	39.1	39.1	39.8	39.5	39.2	39.6	39.2

SUR UN RÉGULATEUR
DE
TEMPÉRATURE APPLICABLE AUX ÉTUVES

PAR M. ROUX.

Les étuves à température constante sont indispensables aux bactériologistes : aussi a-t-on imaginé un grand nombre de régulateurs de température applicables à ces appareils. Il y en a d'excellents qui ont fait leurs preuves. Cependant nous croyons rendre service aux travailleurs en leur faisant connaître un régulateur robuste, simple en même temps que précis, et qui fonctionne depuis plusieurs années à l'Institut Pasteur sans avoir nécessité de réparation.

Ce régulateur est formé de deux barres métalliques, l'une en acier, l'autre en zinc, soudées ensemble sur toute leur longueur et recourbées ensuite en forme d'U.

Le métal le plus dilatable, le zinc, étant en dehors, toute élévation dans la température tendra à rapprocher les branches et tout abaissement les écartera l'une de l'autre. Pour une variation donnée de température, le mouvement des branches de l'U sera d'autant plus étendu que les coefficients de dilatation des deux métaux soudés ensemble seront plus différents ; c'est pour cette raison que l'on a réuni le fer et le zinc. Il faut que les barres métalliques soient assez fortes pour ne pas faire *pincettes*, c'est-à-dire que leurs extrémités doivent rester bien rigides et ne pas se rapprocher d'une façon sensible quand on les serre entre les mains. La réunion de deux métaux de dilatation inégale permet, avec des barres de longueur modérée, d'avoir un déplacement assez étendu. Ces régulateurs bi-métalliques ont été souvent employés, notamment par M. Schaffer, professeur de physiologie à University Collège.

Il y a diverses façons d'utiliser le mouvement des branches pour régler le débit du gaz qui se rend au brûleur de l'étuve On peut faire écraser le tube de caoutchouc conduisant le gaz entre les deux branches métalliques qui se rapprochent par l'échauffe-

ment et diminuer ainsi la flamme. On peut encore fixer une des branches de façon qu'elle soit immobile, et ajuster à l'autre une tige qui suivra ses mouvements et ira ouvrir ou obstruer l'arrivée du gaz combustible. Les mouvements dus à la dilatation du régulateur bi-métallique peuvent être amplifiés au moyen de leviers, et on augmente ainsi la sensibilité de l'appareil.

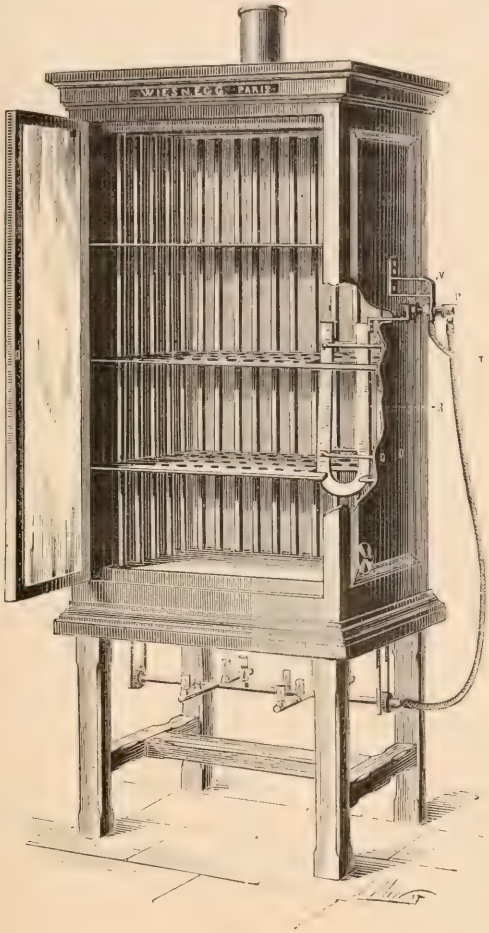


Fig. 1.

Ce régulateur est adapté aux étuves du modèle Pasteur construites par M. Wiesnegg, qui sont très employées dans les laboratoires de microbie (fig. 1); elles sont en effet assez vastes sans être

encombrantes. Depuis que M. Schribaux a remplacé le chauffage à vapeur par le chauffage direct au gaz, elles sont devenues plus commodes encore et consomment très peu de gaz. Le régulateur est placé verticalement près d'une paroi latérale, l'ouverture de l'U vers le haut : une des branches A (fig. 2), la plus éloignée de la paroi, est fixée à l'étuve, l'autre, qui seule peut se déplacer, porte une tige horizontale qui sort de l'étuve par une ouverture suffisante pour qu'elle puisse s'y mouvoir librement. A sa sortie de l'étuve, cette tige est recourbée à angle droit et traversée par une vis *p*, qui peut être fixée à un point quelconque de sa course au moyen d'un écrou *e*. L'extrémité de cette vis peut être amenée au contact d'une petite soupape qui commande l'écoulement du gaz et qui complète l'appareil.

Cette soupape *o*, est formée par un obturateur conique, en laiton, fixé sur une tige qui traverse le tube d'arrivée du gaz. Un petit

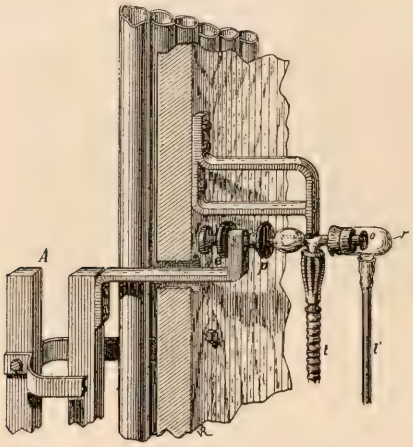


Fig. 2.

ressort, placé dans ce tube même, maintient l'orifice de sortie fermé tant que l'on n'appuie pas sur l'extrémité de la tige de l'obturateur, mais si celle-ci est légèrement repoussée, le tube est ouvert, le gaz se répand dans la petite chambre en verre *r*, et se rend au brûleur par une tubulure. Une petite ouverture, pratiquée dans l'obturateur, laisse passer assez de gaz pour maintenir la flamme du brûleur en veilleuse quand la soupape est fermée. Cet obturateur joue donc le rôle d'un robinet sensible et facile à ouvrir au moyen d'un mouvement en ligne droite et

peu étendu. Il est fixé à la paroi extérieure de l'étuve en face de la tige du régulateur et à peu de distance d'elle, de façon qu'il soit actionné par elle quand on amène la vis à son contact. Un coup d'œil jeté sur la figure ci-jointe fera mieux comprendre le jeu de l'appareil que les détails que nous pourrions ajouter.

Les choses étant ainsi disposées, pour régler l'étuve, on tourne la vis jusqu'à ce que, pressant sur l'extrémité de la tige, elle ouvre largement la soupape et on allume le brûleur. Lorsque le thermomètre placé dans l'étuve marque à moins de 1/2 degré la température que l'on veut atteindre, on tourne la vis jusqu'à ce qu'elle affleure l'extrémité de la tige. L'étuve est alors réglée ; en effet, si elle se refroidit, les branches du régulateur s'écartent, et la vis appuyant de nouveau sur la tige, ouvre l'arrivée du gaz.

Le fonctionnement est très régulier ainsi que le montre le tracé du thermomètre enregistreur (fig. 3). Les grandes oscil-

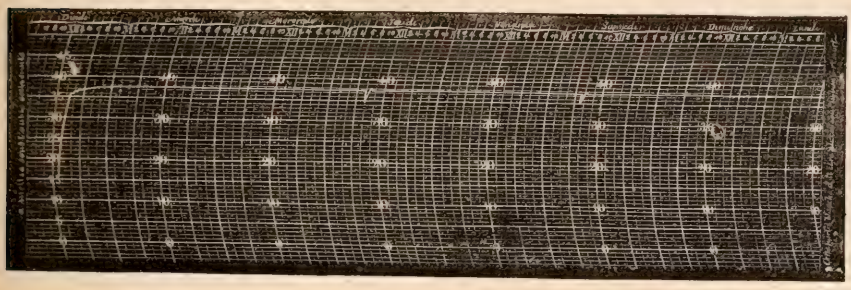


Fig. 3.

lations marquent les ouvertures de l'étuve, mais on voit qu'en marche régulière l'écart maximum ne dépasse pas un demi-degré.

Chaque étage de l'étuve a une température spéciale, mais constante.

Cet appareil, tout à fait robuste, peut être porté à de hautes températures. Avec quelques modifications il peut être employé à régler une étuve chauffée au pétrole ou à l'alcool. Pour l'empêcher de se rouiller dans un milieu humide, on le recouvre d'une couche de noir mat.

La température est très constante avec les deux modèles d'étuve que M. Wiesnegg a munis de ce régulateur. Dans les étuves de dimensions plus petites, le fonctionnement est moins bon parce que le volume d'air est trop petit pour le régulateur, qui

doit avoir une certaine masse si l'on veut lui conserver sa rigidité et sa sensibilité. Pour que la température se maintienne au même degré, il est nécessaire qu'il se fasse un renouvellement lent de l'air ; on réalise cette condition au moyen des ventouses dont l'étuve est munie.

De même que le mouvement de la branche mobile du régulateur ouvre et ferme l'arrivée du gaz, de même elle peut régler le débit d'un courant d'eau, qui refroidira l'étuve en passant dans des tubes de plomb disposés dans son intérieur. Le même appareil peut être un régulateur de froid comme un régulateur de chaleur. En été il est très commode, pour les cultures en gélatine, d'avoir une armoire maintenue ainsi à une température de 23e par un courant d'eau. Le régulateur bi-métallique rend la chose facile.

RECHERCHES SUR LA DIGESTION INTRACELLULAIRE

CHEZ LES PROTOZOAIRES

(2e PARTIE)

Par Félix LE DANTEC.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

Dans une première note[1], j'ai exposé les divers résultats que l'emploi de l'alizarine sulfoconjuguée permet d'obtenir chez les Rhizopodes; ce réactif donne également des renseignements précieux sur la digestion intracellulaire chez les Infusoires ciliés, et démontre chez les animaux de ce groupe l'existence de phénomènes de même genre, et même plus intenses.

Le tournesol nous a donné de mauvais résultats quand nous l'avons employé pour l'étude des *Péritriches:* au contraire, l'alizarine sulfoconjuguée est très avantageuse pour les recherches sur ce groupe dont je prends comme type un genre colonial à pied ramifié rétractile, le *Carchesium*. Un rameau détaché d'une colonie de ces êtres continue à vivre dans les conditions normales, et c'est toujours avec des petits groupes de quatre à cinq individus qu'il convient de faire les préparations.

En disposant en goutte suspendue un de ces groupes avec un peu d'alizarine violette, on peut avoir deux résultats différents suivant les cas.

Le premier cas est celui où les animaux étudiés ont été pris dans un bocal très riche en substances nutritives; alors chaque individu est opaque et bourré de vacuoles, et l'on peut attendre très longtemps sans assister à l'ingestion d'un grumeau d'alizarine, quoique le mouvement ciliaire continue a agiter l'eau à

1. *Annales Inst. Past.*, 25 décembre 1890.

l'extrémité orale; dans ce cas, cette agitation de l'eau semble avoir pour but d'assurer bien plus la respiration que la nutrition; il y a une pléthore qui s'oppose à la formation de nouvelles vacuoles.

Le second cas est celui où les animaux sont, au contraire, soumis depuis quelque temps à un jeûne relatif. Alors, au bout de 7 à 8 minutes, on voit dans l'intérieur de chaque individu, trois à quatre vacuoles colorées de diverses teintes de la zone sensible; quelquefois, quand l'animal est très affamé, les vacuoles nouvelles se produisent successivement avec rapidité, et on les voit former un chapelet dans le prolongement de l'entonnoir œsophagien, la plus rose étant la plus éloignée de l'œsophage devant lequel un grumeau violet tourbillonne en attendant l'ingestion. Cette disposition linéaire des vacuoles avait fait croire à Ehrenberg[1] que toutes ces *vésicules stomacales* pendaient à un boyau intestinal; mais elle ne dure pas longtemps; au bout de 40 à 50 minutes, les vacuoles colorées sont dispersées dans la masse du protoplasma. J'en ai vu jusqu'à 7 dans un même individu, les unes roses, les autres jaunes. Il y a donc une production d'acide très évidente dans les vacuoles digestives de ces êtres. On peut conserver longtemps ces préparations à la chambre humide; cependant, au bout de deux ou trois jours, les individus qui portaient au début le plus de vacuoles colorées sont arrondis sur leur pied contracté, et colorés en rose violet; ils sont morts, tandis que d'autres individus de la même branche ont encore un protoplasma très hyalin avec des vacuoles colorées plus récentes; il est donc probable que l'alizarine ingérée en grande quantité leur nuit à la longue.

Cette nocuité lente du réactif n'infirme pas la valeur des résultats, car il suffit de 25 à 30 minutes pour qu'un grumeau ingéré au violet limite devienne jaune dans une vacuole. La sécrétion d'acide est donc beaucoup plus rapide que chez les Rhizopodes. Elle l'est assez pour que l'on soit sûr de la nature d'un grumeau coloré ingéré, sans écraser l'animal où sans ajouter de l'ammoniaque à la préparation, car le virage progressif dans la zone sensible est au moins aussi caractéristique

1. Ehrenberg, *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*, Leipzig, 1838.

de l'alizarine sulfoconjuguée que le virage brusque au violet par un excès d'alcali.

Il est facile de s'assurer, par le même procédé que pour les Amibes, que le contenu de la vacuole, au début, est toujours de l'eau extérieure; seulement, ici, la sécrétion d'acide étant plus rapide, le grumeau à teinte sensible ingéré ne conserve guère sa nuance plus d'une demi-minute. Ce court laps de temps suffit à démontrer irréfutablement l'ingestion de l'eau, qui, quoique décrite par Dujardin[1] il y a bien longtemps, a été niée depuis par des observateurs plus récents. Je dois reproduire ici la description très remarquable que Dujardin a donnée du phénomène de l'ingestion :

« Le courant produit dans le liquide (par le mouvement vibratile) vient heurter incessamment le fond de la bouche qui est occupé seulement par la substance gélatineuse vivante de l'intérieur; il la creuse en forme de sac ou de *tube* fermé par en bas, et de plus en plus profond, dans lequel on distingue par le tourbillon des molécules colorantes le remous que le liquide forme au fond. Les particules s'accumulent ainsi visiblement au fond de ce tube, sans qu'on puisse voir en cela autre chose que le résultat physique de l'action même du remous. En même temps que le tube se creuse de plus en plus, ses parois formées, non par une membrane, mais par la substance glutineuse seule, tendent sans cesse à se rapprocher en raison de la viscosité de cette substance et de la pression des parties voisines; enfin elles finissent par se rapprocher tout à fait, et se soudent vers le milieu de la longueur du tube en interceptant toute la cavité du fond sous la forme d'une vésicule remplie d'eau et de matières colorantes. »

Nous voyons encore ici, comme chez les Rhizopodes, la tension superficielle du protoplasma au contact du liquide extérieur, lutter contre l'introduction des matières étrangères dans le protoplasma; le mouvement produit dans l'eau par les cils vibratiles, rend l'ingestion plus facile en déterminant au fond de l'entonnoir œsophagien une pression antagoniste de cette tension superficielle. Une autre particularité se joint à celle-là pour faciliter l'ingestion.

Nous avons vu que les vacuoles restent, quelque temps après

1. Dujardin, *Histoire naturelle des Infusoires*, Paris, 1841.

leur formation, au voisinage du fond de l'œsophage. A ce moment, si l'on observe l'animal de profil, on constate que le contour apparent de ces vacuoles est une ellipse dont le grand axe est dans le prolongement de l'axe de l'entonnoir. Dans les *Amibes* où le protoplasme était homogène, ces vacuoles étaient toujours sphériques parce que leur pression interne, partout égale, était équilibrée en tous points par une résistance uniforme. Chez le *Carchesium*, la forme ellipsoïdale de la vacuole montre que la résistance est moindre dans la direction de l'axe de l'œsophage, puisque le rayon de courbure de la vacuole est plus faible aux extrémités de cet axe. Ce phénomène manifeste une différenciation tout à fait comparable à celles que MM. Balbiani et Fabre Domergue ont décrite chez certains Infusoires qui ont un *parcours vacuolaire* tracé jusqu'à l'anus. Dans tous les cas, on voit que cette particularité permet à une pression plus faible de creuser plus profondément le *tube* de Dujardin, c'est-à-dire rend l'ingestion plus facile.

Dans le même ordre d'idées, constatons que les vacuoles devant suivre, au moins au début, un parcours déterminé, la présence d'un grand nombre de vacuoles dans le corps de l'animal détermine un encombrement dans cette première portion différenciée du parcours, lequel encombrement empêche la formation d'un *tube* de Dujardin assez profond; c'est ainsi que le phénomène de pléthore signalé plus haut s'oppose mécaniquement à la production de nouvelles vacuoles.

En répétant souvent l'observation précédente de l'ingestion de l'alizarine par un *Carchesium*, je me suis facilement convaincu que la sécrétion d'acide a lieu avec la même rapidité dans des vacuoles contenant une substance animale ou végétale, et dans des vacuoles ne contenant que des substances minérales non nutritives.

Chez ces animaux bien plus compliqués, nous obtenons donc jusqu'à présent deux résultats communs avec les Rhizopodes :

a. L'eau extérieure est ingérée avec les matières solides.

b. Une sécrétion acide a lieu dans la vacuole, dans tous les cas.

Ces résultats se vérifient facilement chez les autres Péritriches.

Chez l'*Épistylis*, les phénomènes de pléthore sont encore plus remarquables que chez le *Carchesium*, mais la différenciation

du parcours vacuolaire semble moindre, car les vacuoles sont moins allongées au voisinage de l'œsophage. La sécrétion acide est d'ailleurs moins rapide ; en partant du violet limite on arrive bien rarement au jaune ; l'effet nuisible de l'alizarine se manifeste auparavant par la mort de l'animal.

Il en est de même de quelques *Vorticelles*. Tandis que la *V. Convallaria* et la *V. Microstoma* donnent une coloration jaune à l'alizarine violette à peu près aussi vite que le *Carchesium*, je n'ai, au contraire, jamais vu de vacuole jaune chez la *V. nebulifera* quand j'ai nourri cet Infusoire avec de l'alizarine à teinte limite ; les animaux de cette espèce meurent au bout de un à deux jours, ayant toujours eu les vacuoles roses.

Quand cette particularité se présente, on pourrrait croire que la sécrétion de l'acide dans la vacuole cesse dès que son contenu a acquis un certain degré de neutralité, c'est-à-dire que de l'eau non alcaline n'excite plus la sécrétion. J'ai démontré que cette hypothèse n'est pas fondée en nourrissant des individus de ces espèces avec de l'alizarine très rose, à teinte 4, par exemple. Dans ces conditions, j'ai obtenu des vacuoles jaunes, ce qui prouve que le contenu de ces vacuoles peut devenir effectivement acide.

Le résultat négatif obtenu en partant du violet ne peut donc s'attribuer qu'à la lenteur de la sécrétion, jointe à l'action nuisible de l'alizarine ingérée.

Je me suis proposé de constater la sécrétion acide dans une vacuole chez un grand nombre d'Infusoires, de mesurer la rapidité de cette sécrétion, et d'étudier le contenu des vacuoles où une sécrétion acide était mise en évidence, au point de vue de la présence ou de l'absence des matières alimentaires.

La première partie de ce programme était facile à remplir, car après avoir nourri des Infusoires avec de l'alizarine sulfo-conjugée violette, il suffit de voir passer l'un d'eux, même très vite, dans le champ du microscope, et de constater qu'il porte une vacuole rose, pour affirmer que ses vacuoles sont le siège d'une sécrétion acide.

Je n'ai pu en réaliser la 2e partie que pour les grosses espèces visibles à l'œil, et que l'on peut isoler dans une goutte suspendue ; enfin j'ai pu faire l'étude du contenu des vacuoles chez les grosses espèces, en ralentissant leurs mouvements par un apla-

tissement discret sous le couvre-objet; mais il est plus simple et plus général de tuer les Infusoires à observer avec de l'acide osmique dont les vapeurs dissoutes en très petite quantité dans la goutte ne modifient pas la couleur de l'alizarine. Les résultats de cette troisième série de recherches m'amènent à adopter pour l'exposition des phénomènes la classification, proposée par M. Maupas[1], des Infusoires, en *Ciliés à tourbillon* et *capteurs*.

I. *Ciliés à tourbillon*. Parmi les espèces fixes, outre les *Vorticelliens*, nous trouvons les *Stentors* que nous avons déjà étudiés au moyen du tournesol. L'alizarine donne une vérification des résultats obtenus chez le *Stentor Rœselii*, mais semble nuisible au *S. polymorphus* et au *S. cœruleus*.

Chez le *Paramecium Bursaria*, il faut environ une heure pour qu'un grumeau violet devienne jaune; il faut un peu moins de temps chez le *P. aurélia*, mais il en faut beaucoup plus (3 heures environ), chez le *Colpoda Cucullus*.

Il est très difficile d'observer la sécrétion acide chez le *Spirostomum ambiguum*, quoique cette sécrétion soit très rapide (trois quarts d'heure environ pour passer du violet au jaune). Les individus de cette espèce portent, en effet, peu de vacuoles, même dans les milieux très nutritifs; l'alizarine teint leur corps en violet pâle sans paraître leur nuire.

J'ai simplement constaté l'existence d'une sécrétion acide chez le *Strombidium sulcatum* et les *Euplotes*, trop petits pour être isolés.

Chez tous les Infusoires à tourbillon j'ai constaté que l'ingestion des substances non alimentaires est très fréquente. La sécrétion acide se fait avec la même rapidité dans les vacuoles contenant l'alizarine seule ou l'alizarine accompagnée de substances animales ou végétales. Pour compléter ces résultats, j'ai nourri des *Paramécies* avec du lait coloré en violet par l'alizarine et avec de l'amidon de riz mis en suspension dans une solution violette d'alizarine.

Il est très curieux de voir avec quelle rapidité les Infusoires ingèrent ces substances qui ont à peu près toutes deux les mêmes dimensions (globules gras et grains d'amidon de riz) et qui sont

1. Maupas, *Arch. de zool. exp. et gén.*, 1888, p. 186.

rejetées sans avoir subi aucune modification sensible. Avec le lait, par exemple, j'ai vu une *Paramécie* contenir au bout d'une heure 27 vacuoles colorées des diverses nuances de la zone sensible. Chaque vacuole contenait un groupe de globules gras baigné dans un liquide aqueux coloré. De même pour les grains d'amidon.

II. *Ciliés capteurs.* J'ai étudié dans ce groupe des *Glaucomes*, des *Prorodons*, des *Nassules* et des *Coleps*.

Dans tous ces genres j'ai constaté la production d'un acide dans les vacuoles. Chez le *Colepshirtus*, la couleur passe du violet au jaune en moins d'une demi-heure.

Je n'ai jamais vu chez ces animaux une vacuole contenant exclusivement de l'alizarine. Toutes les vacuoles contenant de l'alizarine étaient le siège d'une sécrétion acide, mais elles contenaient toutes, avec la matière colorante, une substance alimentaire d'origine animale ou végétale. Ceci prouve que les *capteurs* sont susceptibles de choisir leur nourriture ; c'est une sélection différente de celle dont M. Greenwood[1] supposait les *Amibes* capables, en admettant que dans ces animaux il ne se faisait pas de sécrétion autour des substances ingérées non nutritives. Toutes les observations que j'ai faites me permettent, au contraire, d'affirmer qu'il y a toujours sécrétion d'un acide dans les vacuoles des Infusoires vivant librement dans l'eau.

J'ai spécifié avec intention qu'il s'agissait des Infusoires vivant librement dans l'eau ; je n'ai pu, en effet, trouver aucune sécrétion analogue chez un Infusoire parasite du rectum de la grenouille, le *Nyctotherus cordiformis*. Cet être vit au milieu du mucus glaireux de ce rectum, et se nourrit de ce qu'il contient ; il ingère naturellement ce mucus comme les Infusoires de l'eau ingèrent l'eau, et ses vacuoles en sont pleines. Cet animal qui vit facilement plusieurs jours quand on délaie dans de l'eau le contenu du rectum, n'ingère rien pendant son séjour dans ce milieu ; jamais il ne porte une vacuole contenant de l'eau.

C'est donc seulement pour les Infusoires vivant librement dans l'eau que nous établissons les conclusions suivantes :

1. Greenwood, *On the digestive process in some Rhizopods. Journal of Physiology*, 1886.

1° Chez tous les Infusoires étudiés, les matières solides ingérées sont toujours accompagnées dans la vacuole d'ingestion d'une certaine quantité de l'eau extérieure ;

2° Les *Infusoires à tourbillon* ingèrent indistinctement toutes les matières solides existant en suspension dans le liquide où ils vivent. L'ingestion est limitée par une sorte de pléthore, qui, dans certains cas, semble s'opposer mécaniquement à la formation de nouvelles vacuoles.

Les *Infusoires capteurs* semblent, au contraire, faire un choix dans leur ingestion ; ils n'avalent de substance non nutritive qu'avec une substance véritablement alimentaire, à laquelle la première était peut-être adhérente.

3° Dans tous les cas, chez les Infusoires étudiés, la vacuole digestive est le siège d'une sécrétion acide qui neutralise d'abord l'alcalinité de l'eau ingérée, et qui continue, quand la neutralité est atteinte, de façon à donner au contenu de la vacuole une acidité effective. Cette sécrétion se manifeste avec la même intensité dans les vacuoles contenant des matières solides animales, végétales, ou minérales ;

4° Il y a des différences très considérables dans la rapidité de la sécrétion d'acide chez les diverses espèces, et dans la nocuité pour chacune d'elles des substances chimiques ingérées, ce qui paraît indiquer des différences notables dans la constitution du protoplasma chez ces espèces ;

5° Chez toutes les espèces pour lesquelles le tournesol nous a donné des résultats, on peut ajouter que l'acide sécrété semble le même, et que c'est un acide fort.

Nous aurions maintenant à nous demander où se secrète cet acide. Il semble bien que sa sécrétion ne soit localisée nulle part, au moins chez les Amibes. La vacuole est à l'origine une simple goutte d'eau noyée au milieu du protoplasma. Mais comment ce protoplasma donne-t-il naissance à une sécrétion acide ? C'est là une question que l'on peut éclairer en invoquant des phénomènes de dialyse, et que je réserve pour une étude ultérieure.

ACTION DE L'ACIDE SULFUREUX

SUR QUELQUES CHAMPIGNONS INFÉRIEURS

ET EN PARTICULIER SUR LES LEVURES ALCOOLIQUES

PAR M. G. LINOSSIER.

La pratique du mutage des vins, l'emploi de l'acide sulfureux pour la conservation des liquides fermentescibles, son usage comme antiseptique, donnent quelque intérêt à l'étude de l'action toxique de ce gaz sur les organismes inférieurs. Nous ne possédons sur ce point, en dépit de nombreux travaux, que des notions assez confuses. Le motif en est que les expérimentateurs, cherchant à se rapprocher le plus possible des conditions réalisées dans la pratique, se sont à peu près exclusivement appliqués à déterminer le poids de soufre qu'il est nécessaire de brûler dans une enceinte limitée pour détruire les organismes qui s'y trouvent. Or il est clair que ce poids sera fort différent, suivant que les organismes seront à l'état sec ou en suspension dans un liquide; dans ce dernier cas, la seule fraction active du gaz toxique est celle qui se dissout dans le liquide, et qui, si elle augmente avec la richesse de l'atmosphère en acide sulfureux, ne lui est pas forcément proportionnelle; des conditions multiples de température, de pression, de profondeur de la couche liquide, d'agitation, etc., entrent en jeu pour la modifier, et il en résulte dans toutes les déterminations une incertitude extrême. La notion qu'il importerait avant tout de posséder, la seule que l'on puisse espérer acquérir avec quelque précision, c'est celle de la dose d'acide sulfureux dissous qui peut détruire en un temps donné un organisme déterminé maintenu au sein de la dissolu-

tion : c'est précisément ce dont se sont le moins occupé les expérimentateurs qui ont abordé le problème de l'action toxique de l'acide sulfureux.

J'ai cherché à combler, dans une certaine mesure, cette lacune en déterminant la toxicité de l'acide sulfureux dissous, à l'égard des levures alcooliques et de quelques autres champignons inférieurs.

*
* *

Même ainsi défini, le problème n'est pas sans présenter quelque difficulté, car cette toxicité est éminemment variable : elle varie non seulement d'un organisme à un autre, mais encore, pour le même organisme, avec la durée du contact de l'être vivant avec l'agent toxique, la température et la composition chimique du milieu au sein duquel est réalisé ce contact; elle varie suivant que l'organisme étudié est jeune ou vieux, elle varie enfin selon le degré de résistance individuelle de chaque cellule, et cette résistance est souvent très différente même chez des cellules d'une même descendance.

Toutefois, pour chaque espèce, dans des conditions expérimentales toujours aussi identiques à elles-mêmes que possible, il existe pour toute substance toxique des doses qui ne tuent jamais, des doses qui tuent quelquefois, et des doses qui tuent toujours : c'est la dose minimum parmi les doses constamment toxiques que je me suis appliqué à déterminer.

Pour ce faire, je préparais une série de solutions d'acide sulfureux dans l'eau distillée, renfermant par litre 500, 200, 100, 40, 20, 10, 4 et 2 centimètres cubes de gaz[1]; le titre était déterminé à l'aide d'une solution titrée d'iode. A 100^{cc} de chacune d'elles, j'ajoutais 1^{cc} d'une culture pure et récente du champignon soumis à l'expérience; les mélanges ainsi obtenus étaient immédiatement transvasés dans des flacons que l'on remplissait jusqu'au goulot et qu'on maintenait soigneusement bouchés. Après un quart d'heure, six heures, vingt-quatre heures et quelquefois après cinq jours, je prélevais une goutte du contenu de chaque flacon, pour la transporter dans un liquide aussi favo-

1. On a admis qu'un litre d'anhydride sulfureux pèse constamment 2 gr. 7, en nombre représentant son poids moyen dans les conditions de température et de pression dans lesquelles ont été effectuées ces expériences.

rable que possible à la culture du champignon, et j'observais s'il se produisait un développement.

Le tableau I résume les résultats des expériences.

La première colonne fait connaître la nature des champignons soumis à l'action toxique de l'acide sulfureux, ce sont :

1° Une levure de bière basse provenant d'une brasserie lyonnaise;

2° Une levure recueillie sur des raisins blancs;

3° Une levure trouvée à la surface de raisins de Corinthe;

4°, 5°, 6° Trois levures extraites d'une fermentation spontanée de moût de fraises;

7° La mycolevure de M. Duclaux;

8° et 9° Deux variétés de *mycoderma vini* extraites du même voile mycodermique;

10° Le champignon parasite qui provoque dans la bouche l'affection connue sous le nom de muguet;

11° L'*aspergillus niger*.

Les seconde, troisième, quatrième et cinquième colonnes du tableau indiquent en centimètres cubes par litre, et pour chaque durée de contact, les doses minima d'acide sulfureux qui tuent d'une manière constante chaque organisme.

TABLEAU I

ORGANISMES	DOSES TOXIQUES (par litre).			
	15 minutes	6 heures	24 heures	5 jours
1. Levure de bière.	200cc	100cc	20cc	»
2. Levure de raisins.	100cc	20cc	20cc	10cc
3. Levure de raisins de Corinthe.	200cc	40cc	20cc	20cc
4. Levure de fraises (*a*).	200cc	20cc	10cc	10cc
5. Levure de fraises (*b*).	100cc	40cc	10cc	10cc
6. Levure de fraises (*c*).	200cc	40cc	40cc	20cc
7. Mycolevure.	200cc	100cc	40cc	20cc
8. Mycoderma vini (*a*).	200cc	100cc	100cc	40cc
9. Mycoderma vini (*b*)	200cc	100cc	20cc	20cc
10. Muguet.	500cc	100cc	20cc	20cc
11. Aspergillus niger.	50cc	20cc	10cc	»

La lecture de ce tableau montre combien peut varier la résistance à l'action de l'acide sulfureux chez des organismes orphologiquement et physiologiquement très voisins; il n'est

pas sans intérêt de noter au passage que l'échelle de vulnérabilité se modifie suivant la durée du contact avec l'agent toxique. Ainsi, le muguet, qui est le plus résistant de tous les champignons désignés dans le tableau à une action rapide de l'acide sulfureux, résiste beaucoup moins que le *mycoderma vini* (*a*) à une action prolongée pendant vingt-quatre heures.

Toutefois, en dépit des différences individuelles, il est quelques conclusions générales qui peuvent être dégagées de l'ensemble des expériences :

1° Une solution renfermant un cinquième de son volume d'acide sulfureux a détruit tous les champignons abandonnés à son contact pendant un quart d'heure, sauf le muguet pour la destruction duquel la dose d'acide sulfureux a dû être portée à 500^{cc} par litre ;

2° Si le contact est prolongé dix heures, aucun champignon ne résiste à une solution renfermant un dixième de son volume, soit 100^{cc} d'acide sulfureux par litre ;

3° Si l'action s'exerce pendant vingt-quatre heures, la dose toxique s'abaisse à un vingt-cinquième du volume, soit 40^{cc} par litre, sauf pour une des variétés de *mycoderma vini*, qui, *dans une expérience sur trois*, exige pour sa destruction 100^{cc} par litre ;

4° Enfin, si l'expérience est prolongée plusieurs jours, 20^{cc} par litre, soit un cinquantième du volume, suffisent pour détruire tous les champignons, sauf ce même *mycoderma vini*.

Ces doses témoignent d'une action énergique de l'acide sulfureux : il suffit de les exprimer en poids pour constater qu'elles sont comparables et parfois inférieures aux doses actives des plus puissants antiseptiques. Ce sont : $1^{gr},35$ par litre (1/750) si la durée n'est que de quinze minutes; $0^{gr},27$ par litre (1/3700) si la durée en est d'une heure; $0^{gr},108$ par litre (1/9000) s'il est prolongé vingt-quatre heures, et enfin $0^{gr},054$ par litre (1/18000) si l'action toxique s'exerce pendant plusieurs jours.

Encore sont-ce là les doses dont l'action toxique sur les champignons inférieurs semble générale. Mais il est des organismes, comme l'*aspergillus niger* et certaines levures, qui ne résistent pas vingt-quatre heures à un trente-six millième d'acide sulfureux.

*
* *

Les nombres ci-dessus n'ont, je le répète, quelque soigneusement qu'ils aient été déterminés, qu'une valeur relative. Ils sont vrais pour certaines conditions expérimentales, mais il suffirait de modifier ces conditions pour modifier les nombres eux-mêmes et faire ainsi ressortir leur caractère contingent.

J'ai cherché par exemple quelle est la dose d'acide sulfureux qu'il faut ajouter à un moût, pour qu'une levure y ensemencée ne put s'y développer. J'ai constaté que 25^{cc} de gaz par litre de moût étaient nécessaires pour obtenir ce résultat avec la levure de raisins et la levure de fraises (*c*), ensemencées respectivement dans des moûts de raisins et de fraises. Si, dans les mêmes milieux, ensemencés avec les mêmes levures, on veut arrêter la fermentation en pleine activité, la quantité nécessaire d'acide sulfureux est la même, s'il s'agit de moût de raisins, mais doit être doublée pour interrompre une fermentation de moût de fraises.

Ces nombres sont du même ordre de grandeur que ceux du tableau I, et concordent assez bien avec eux. Toute concordance entre les résultats disparaîtra, au contraire, si l'on fait varier la température ou la réaction chimique du milieu au sein duquel agit l'acide sulfureux.

En ce qui concerne l'influence de la température, j'ai constaté fort nettement qu'à 35° l'action toxique de l'acide sulfureux sur une levure de raisins et le champignon du muguet est plus marquée qu'à 20°; c'est un résultat analogue à celui que MM. Chauveau et Arloing ont constaté à propos du phénol[1].

De même pour la réaction : la présence de quantités même très faibles d'un acide minéral exalte constamment et d'une manière remarquable la toxicité de l'acide sulfureux. On peut en juger par le tableau suivant, dont la disposition est la même que celle du tableau I :

TABLEAU II

ORGANISMES.		DOSES TOXIQUES (PAR LITRE)		
		15 minutes	6 heures	24 heures
Levure de raisins	sans SO^4H^2.....	100^{cc}	20^{cc}	20^{cc}
	0^{gr}25 SO^4H^2 p^r lit.	40^{cc}	4^{cc}	4^{cc}
Muguet	sans SO^4H^2.....	500^{cc}	100^{cc}	20^{cc}
	0^{gr}49 SO^4H^2 p^r lit.	500^{cc}	10^{cc}	2^{cc}

1. *Bull. de l'Ac. de Médecine* 1884, p. 604.

Il est à peine nécessaire d'ajouter que l'on s'est assuré, par des expériences préalables, que les quantités d'acide sulfurique employées étaient incapables par elles-mêmes, non seulement de tuer l'organisme, mais même d'entraver son développement. Elles ont suffi pourtant pour décupler l'action toxique. Dans ces conditions nouvelles un quatre-vingt-dix millième d'acide sulfureux a pu détruire la levure, et un cent quatre-vingt millième le champignon du muguet.

Ces résultats sont intéressants à un double point de vue : ils montrent entre quelles limites éloignées peut varier la valeur toxique d'une même substance à l'égard des organismes inférieurs, quand on modifie les conditions de son action, et, d'autre part, l'exaltation remarquable de la toxicité de l'acide sulfureux par de petites quantités d'un acide minéral pourra vraisemblablement être mise à profit dans quelques-uns des nombreux cas où cette toxicité est utilisée.

LES MALADIES DU BÉTAIL EN AUSTRALIE

PAR MM.

A. BRUCE,
Inspecteur en chef du bétail,
à Sydney.

ET

A. LOIR,
Directeur de l'Institut Pasteur
australien.

Le continent de l'Australie, dont la prise de possession par l'Angleterre remonte seulement à cent ans, est divisé en cinq colonies. Avec une superficie presque égale à celle de l'Europe, il ne possède que quatre millions d'habitants et doit être considéré comme une région essentiellement pastorale.

Les animaux indigènes sont presque tous des marsupiaux. Les nombreux animaux de ferme de la colonie proviennent tous d'importations faites dans le cours de ce siècle; avec ces animaux ont été introduites un assez grand nombre de maladies, auxquelles ils sont sujets dans les autres pays. L'Australie étant une île éloignée de toute autre contrée, il est assez facile d'y suivre l'introduction et le développement des maladies du bétail, et aussi de voir à quelles circonstances particulières la contrée doit de ne pas connaître certaines maladies, telles que la rage, par exemple, grâce aux mesures prohibitives prises par le gouvernement, et aux dispositions sévères imposées par les règlements de la quarantaine.

Nous pensons qu'il sera intéressant de prendre quelques-unes de ces maladies et de les suivre dans leur histoire australienne.

ANTHRAX. En 1847, soixante ans après la première importation du bétail, l'anthrax fit son apparition en Australie, dans une ferme appartenant à M. Cordeaux, à Leppington, localité du

1. La statistique pour 1889 comptait : Chevaux, 1,504,137. Bovidés, 9,278,540. Moutons, 96,580,639. Porcs, 1,410,205.

comté de Cumberland, il fut appelé, à cause de cela, « Cumberland disease » ; depuis cette époque, il est aisé de suivre les progrès et l'envahissement du mal, qui gagne peu à peu chaque année.

En 1851, une commission royale fut nommée à l'effet de découvrir la nature de cette maladie, et il semble qu'elle l'ait identifiée avec le charbon.

Mais ce n'est en réalité qu'en 1888 que la preuve absolue de l'identité du *Cumberland disease* et du sang de rate fut donnée par la mission Pasteur, composée de MM. Germont, Hinds et Loir.

Peu de temps après cette identification, et à la requête du gouvernement de la Nouvelle-Galles du Sud, des expériences semblables à celles de Pouilly le Fort, furent faites avec le même succès et prouvèrent d'une manière éclatante l'efficacité du vaccin Pasteur contre le *Cumberland disease*. Depuis août 1890, il a été établi à Rodd'Island, près de Sydney, un laboratoire où les propriétaires australiens peuvent se procurer le vaccin Pasteur nécessaire à l'inoculation de leurs bœufs et moutons.

Il est difficile, quant à présent, de donner un chiffre exact de la mortalité annuelle du bétail causée par cette maladie, parce qu'un grand nombre de squatters (propriétaires fermiers) évitent autant que possible de laisser savoir que leurs troupeaux sont atteints. Le chiffre approximatif, donné par les rapports officiels des inspecteurs du gouvernement, est par an, pour la colonie seule de la N.-G. du Sud, de *deux cent mille moutons* sur un total de 56,000,000 de têtes. La mortalité est d'environ 15 0/0 dans les régions atteintes par l'épidémie.

Pendant les quatre derniers mois de 1890, 150,000 moutons, environ, ont été inoculés par le vaccin Pasteur; ils sont dans les propriétés infestées; le succès final de ces vaccinations ne sera définitivement prouvé que vers la fin d'avril 1891. Jusqu'à présent, la mortalité à la suite de la vaccination a été insignifiante, et les moutons paraissent résister très bien à la maladie qui est très meurtrière cette année.

Péripneumonie. — La péripneumonie a fait sa première apparition en Australie, en 1858. Elle a été introduite dans la station de M. Boadle, du district de Plenty (colonie de Victo-

ria), par une vache que cet éleveur avait achetée en Angleterre.

Cette vache avait eu, dit-on, une attaque de péripneumonie quelque temps avant son achat; elle avait été traitée, puis guérie; mais il paraît certain à présent que la guérison n'avait été qu'incomplète, car peu de temps après son débarquement à Melbourne, elle eût une rechute et mourut. Elle contamina les bestiaux de ce propriétaire, qui, à leur tour, passèrent la maladie aux troupeaux des environs.

Les transports des marchandises, à cette époque, ne se faisaient qu'au moyen d'attelages de bœufs, qui portèrent ainsi, dans toute la province de Victoria, la contagion et l'épidémie. Dès lors, la maladie, ainsi répandue, gagna vite les colonies voisines : elle a maintenant atteint les extrémités nord de la colonie du Queensland, colonie qui possède le plus de bêtes à cornes, 4,654,932 bovidés.

Les éleveurs du Queensland, obligés, pour trouver un écoulement à leurs produits, de vendre leurs bestiaux sur les marchés de la N.-G. du Sud et de Victoria, ne peuvent les diriger par le chemin de fer ; ils sont obligés de suivre les routes tracées spécialement dans ce but. La distance à parcourir varie de 500 milles environ à 1,500 milles; les troupeaux fournissent une course moyenne de 8 à 10 milles par jour; or pendant ces voyages qui durent de 2 à 6 mois, le bétail traverse les contrées dans lesquelles la péripneumonie fait le plus de ravages. En admettant que les animaux fussent indemnes en partant, ils gagnent la maladie et la communiquent aux jeunes animaux qu'ils rencontrent sur leur route; il n'est pas rare que, sur une expédition de 1,500 à 2,000 bœufs, on n'ait à constater, à leur arrivée sur le marché, une mortalité de 25 à 35 0/0. La perte annuelle causée par cette infection, est d'environ 16,000,000 de francs.

L'inoculation de Willems contre la péripneumonie a été introduite en Australie, vers 1862, et depuis cette époque elle a été employée dans toutes les colonies avec un réel succès. Mais la grande difficulté était de pouvoir se procurer du virus pour le bétail, avant de le mettre en route.

Pour supprimer cet obstacle, les membres de la mission Pasteur, MM. Germont et Loir, après leurs démonstrations heureuses de l'efficacité de la vaccination contre l'anthrax dans

la Nouvelle-Galles du Sud, furent invités, par le gouvernement de Queensland, à faire, dans cette colonie, des expériences dans le but de trouver un procédé pour la conservation du virus; ils firent l'épreuve du procédé que M. Pasteur avait indiqué en 1882, et qui permet d'avoir facilement à sa disposition une grande quantité d'un virus frais et pur.

D'après le système de Willems, une vache, inoculée à la queue avec le virus du poumon d'un animal mort de la péripneumonie, éprouve une légère réaction. Si l'opération est bien faite avec du virus pur, la queue n'est pas endommagée, et la bête est à l'abri de la maladie.

Mais si l'inoculation est faite dans ce que Bouley appelle une *partie défendue*, c'est-à-dire dans un endroit autre que la queue, derrière l'épaule, par exemple, il se produit un gros œdème, contenant une grande quantité d'un virus pur que M. Pasteur a montré être d'un effet aussi puissant que celui que l'on retire du poumon. Ainsi donc on peut toujours avoir le virus nécessaire à sa disposition, en inoculant un jeune veau dans une de ces régions défendues, et en recueillant la sérosité de l'œdème.

Ce procédé n'avait jamais été mis en pratique auparavant, il répond absolument aux besoins des propriétaires australiens; et actuellement il fonctionne dans deux petites stations de Queensland; là dans chacune de ces stations, on entretient continuellement un veau sous l'action de l'inoculation dans une partie défendue; généralement, chaque quinzaine, un veau meurt, portant un gros œdème, avec la sérosité duquel on remplit des petits tubes stérilisés. Lorsqu'un squatter désire envoyer son bétail sur les marchés du Sud, il fait prendre à la station la plus voisine un de ces tubes qu'il paie 26 francs, il inocule aussitôt un veau derrière l'épaule; au bout d'environ trois semaines, il se forme un gros œdème renfermant une grande quantité de virus avec lequel on inocule à la queue les animaux qu'on veut faire voyager, et qui sont ainsi protégés contre les atteintes de la péripneumonie. Ces inoculations se font en grand et sont maintenant dans la pratique courante : tous les squatters en reconnaissent l'efficacité.

Il y a quelque temps, environ 2,000 vaches furent inoculées avec le virus d'un veau, qui était le cinquième d'une série entre-

tenue dans une des petites stations. Au moment du départ de ce troupeau arrivaient 19 nouvelles vaches, non vaccinées; les deux groupes partirent ensemble. Après 2,000 kilomètres, ces animaux arrivèrent à destination ; les 2,000 bêtes vaccinées étaient en bonne condition. tandis que sur les 19 non inoculées, 8 étaient mortes de la péripneumonie.

Le gouvernement de Queensland, dans le but de perfectionner encore la conservation du virus, vient de charger officiellement M. Loir de procéder à de nouvelles recherches, auxquelles il se livre dans son laboratoire de Rodd'Island, près de Sydney.

Hydrophobie. — La rage est inconnue en Australie. Il est imposé une quarantaine de six mois pour les chiens qui, d'ailleurs, ne peuvent venir que d'Angleterre. Comme la traversée d'Angleterre en Australie est au minimum de trente jours. on n'importe que des chiens de prix. Ces animaux, naturellement surveillés de près avant d'entreprendre ce grand voyage, courent peu le risque d'être mordus avant le départ, et s'ils l'avaient été, il y a de grandes probabilités pour qu'ils meurent, soit pendant le voyage, soit pendant la quarantaine. Toutes ces raisons expliquent comment on n'a en effet constaté en Australie aucun cas de rage.

Gale du mouton. — Le rapport, pour l'année 1866, de M. le chef inspecteur du bétail Bruce, commence ainsi : « J'ai l'honneur de vous annoncer que les moutons de cette colonie sont complètement exempts de la gale. Comme ce résultat vient d'être heureusement atteint, il peut être intéressant et instructif de faire une courte histoire de l'origine et de l'extension de la maladie et de passer en revue les moyens employés par les propriétaires pour la combattre, puis d'indiquer les procédés que l'on suit maintenant pour protéger ces animaux contre une nouvelle invasion. »

L'origine de la maladie a été très clairement démontrée. L'infection des moutons des districts de Hamoi et de Boyau, dans lesquels on a découvert la gale, vient, sans contredit, de quelques moutons gras amenés de Sydney et de Maitland, au commencement de 1862. Ces moutons de boucherie ont été infectés par des moutons importés d'Europe pour la reproduc-

tion et débarqués étant en puissance de maladie. Vers 1864. on a relevé plusieurs cas pareils.

Pendant l'année précédente, 350,000 moutons avaient été malades. Près de 142,191 ont été traités et guéris, avant que la loi de 1863 ait été appliquée. Depuis cette loi, qui oblige les propriétaires à traiter les moutons sous le contrôle de l'Etat, 206,809 moutons, presque tous infectés, ont été guéris.

Un grand nombre de remèdes ont été essayés, dont le meilleur est, sans contredit, un bain de feuilles de tabac et de fleur de soufre. Depuis 1866, la maladie n'a pas reparu.

RÈGLEMENT DES QUARANTAINES

Le propriétaire qui veut importer du bétail en Australie doit prévenir le gouvernement de son intention.

L'introduction de tout bétail atteint d'une maladie quelconque est prohibée. Aucun animal ne peut être débarqué sans l'autorisation écrite d'un inspecteur du bétail.

L'introduction des bovidés et ovidés est défendue, à moins qu'ils ne viennent de l'Angleterre ou de l'Irlande, ou n'y aient séjourné quatorze jours avant l'embarquement.

Les porcs ne peuvent être introduits que s'ils viennent de l'Angleterre ou de l'Irlande.

Les chèvres et les daims peuvent être importés des pays autres que l'Angleterre et l'Irlande, mais seulement pour les jardins zoologiques, et dans ce cas ils doivent subir la quarantaine.

Le propriétaire qui importe un animal doit en donner avis à l'inspecteur en chef du bétail, au moins vingt-huit jours avant le débarquement.

Au moment de l'embarquement pour l'Australie, les animaux doivent être accompagnés d'une déclaration du propriétaire constatant le bon état de santé, et d'un certificat d'un médecin vétérinaire.

Tout le bétail pour l'usage du bord doit être examiné avant le départ, aux frais de l'armateur, par un médecin vétérinaire, qui délivrera, pour ledit bétail, un certificat au capitaine du bateau. La personne chargée du bétail à bord, doit faire un rapport

sur la santé de tous les animaux pendant le voyage, rapport qui sera certifié par le capitaine.

Les peaux des animaux abattus ou morts pendant le voyage ne peuvent être débarquées.

Les chiens et tout le bétail doivent être mis en quarantaine à bord, et la personne chargée de leur donner des soins est seule autorisée à les toucher.

En arrivant, le capitaine signe une déclaration établissant l'état de santé du bétail qu'il a à son bord. Ce bétail est examiné par un inspecteur et un médecin-vétérinaire. Si on trouve, à l'inspection, que le bétail est contaminé, il doit être détruit suivant les ordres du ministre compétent. Si les animaux ne sont pas contaminés, les chevaux de toutes contrées sont débarqués. Les autres animaux sont envoyés en quarantaine. Le bétail doit être conduit, par mer, à la quarantaine, il est gardé aux frais et aux risques des propriétaires.

La durée de la quarantaine est de :

Chameaux	90 jours
Bovidés.	60 —
Ovidés	90 —
Chèvres, daims, etc.	60 —
Chiens	6 mois

Les animaux ne peuvent quitter la quarantaine sans un certificat d'un inspecteur et d'un vétérinaire.

REVUES ET ANALYSES

LA TUBERCULINE

REVUE CRITIQUE

Le temps n'est pas encore venu de formuler un jugement définitif sur la méthode de guérison de la tuberculose inventée par M. Koch. Nous tenons pourtant à donner aux lecteurs des *Annales*, habitués à être tenus au courant de tout ce qui se passe d'important dans le domaine de la microbie, un aperçu du grand mouvement scientifique qui a été provoqué par la découverte de la *tuberculine*. Il n'y en a certainement jamais eu qui se soit traduit, en aussi peu de temps, par une pareille somme d'efforts et de travaux. Aussi, vu l'impossibilité de passer en revue tous les mémoires publiés sur la matière, nous nous bornerons aux plus importants d'entre eux.

C'est à la séance d'inauguration du Congrès international de médecine, ouvert à Berlin le 4 août 1890, que M. Koch [1] fit connaître brièvement sa découverte (alors encore incomplète) de substances capables de donner aux cobayes sains l'immunité contre la tuberculose, et d'arrêter complètement, chez ces mêmes animaux, l'évolution d'une tuberculose générale très avancée.

On comprendra facilement l'effet produit par cette communication si on songe que jusque-là tous les travaux si variés dirigés vers la guérison de la tuberculose n'avaient encore rencontré que des échecs. Pour n'en citer que quelques-uns, MM. Arloing et Charrin avaient constaté qu'une première inoculation de la tuberculose ne conférait aucune immunité contre une inoculation ultérieure, et dans un travail fait dans le laboratoire même de M. Koch, M. Cornet avait vainement employé les procédés les plus variés pour guérir des cobayes de la tuberculose.

Ni dans sa communication au Congrès de Berlin, ni dans une

1. *Ueber bacteriologische Forschung.* Discours, Berlin, 1890.

seconde note[1] sur le traitement de la tuberculose, M. Koch ne donnait la composition de son remède, et c'est seulement dans un dernier mémoire[2] qu'il a brièvement indiqué la provenance et le mode de préparation de la tuberculine. Cette substance, tantôt désignée simplement comme « remède », tantôt comme « lymphe », est un extrait glycériné de cultures pures de la tuberculose. On y trouve à côté de sels minéraux et de matières extractives, une substance active soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool, et traversant facilement les membranes dialysantes. Comme elle peut supporter l'ébullition, elle ne semble point appartenir au groupe des *toxalbumines*, mais être un dérivé des substances albuminoïdes.

Déjà avant la révélation par M. Koch de son secret, on s'était douté, de différents côtés, que le remède antituberculeux provenait de cultures du bacille de la tuberculose[3], et on s'était mis au travail pour préparer des tuberculines plus ou moins analogues à celles de Koch. Dès la première goutte de lymphe dont nous pûmes disposer au laboratoire, nous constatâmes, M. Roux et moi, qu'elle présentait cette odeur particulière propre aux cultures des bacilles tuberculeux (aviaires et humains) sur des milieux glycérinés. De l'existence de cet arome et de la présence de glycérine dans la lymphe, il n'était pas difficile de conclure que ce liquide contenait les produits de cultures tuberculeuses dans des milieux glycérinés.

MM. Hueppe et Scholl[4] ont de leur côté préparé, par l'évaporation de cultures du bacille tuberculeux sur des milieux glycérinés renfermant de 8 à 10 0/0 de peptone, une lymphe qui, inoculée à des cobayes tuberculeux, a provoqué la guérison rapide de processus tuberculeux locaux. Contrairement à M. Buchner, qui admet que la tuberculine est une espèce de protéine extraite du corps même des bacilles, MM. Hueppe et Scholl affirment que la substance active de la lymphe de M. Koch est un produit d'échange vital des bacilles vivant dans un bouillon glycériné. La glycérine introduite dans le liquide de culture suffit à assurer la préparation d'une tuberculine active par voie de simple évaporation, et sans qu'il soit nécessaire de faire un extrait glycériné. Dans nos expériences, nous avons constaté, M. Roux et moi, et conformément à l'opinion de MM. Hueppe et Scholl, que la partie liquide des cultures du bacille de la tuberculose provoque en général, sur les cobayes tuberculeux, une réaction fébrile plus intense que l'extrait glycériné des corps des bacilles séparés de leur milieu de culture.

1. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1890, n° 46 a., p. 1029.
2. *Ibid*, 1891, n° 3, p. 101.
3. Voir *Bulletin médical*, 1890; *Munch. med. Wochenschr.*, 1890, n° 25.
4. *Berliner Klin. Woch.*, 1891, n°s 4 et 8.

M. Crookshank[1] avait aussi, avant la dernière publication de M. Koch, préparé des cultures du bacille tuberculeux dans du bouillon glycériné, et obtenu, par la filtration de ces cultures, une substance toxique très active. M. Bujwid[2] avait obtenu, de son côté, un liquide analogue à la lymphe de M. Koch, en traitant par l'eau des cultures sur gélose, filtrant sur des filtres de porcelaine, et évaporant le liquide filtré dans le vide, ou bien encore en évaporant à un certain degré de simples cultures du bacille tuberculeux dans du bouillon. Le liquide de M. Bujwid provoqua une élévation de température chez des cobayes sains et un lapin tuberculeux, un collapsus chez un cobaye tuberculeux. Injecté à la dose de 0,01 gr. dans un cas de lupus de la face, il provoqua une hyperthermie à 39°, des frissons, et une réaction locale qui aboutit à la formation d'eschares. Ce liquide de M. Bujwid, et aussi celui de MM. Hueppe et Scholl, quoique analogues à la lymphe de M. Koch, sont cependant, de l'aveu de leurs auteurs, moins actifs dans leur influence sur l'organisme.

II

Comme l'action de la tuberculine sur le cobaye constitue l'assise fondamentale des recherches que M. Koch a poursuivies pendant des années, il est bien regrettable que ce savant s'obstine à ne pas donner le détail des résultats auxquels il est arrivé. Ainsi il n'indique ni les doses de tuberculine nécessaires pour donner l'immunité ou arrêter l'évolution de la maladie chez les cobayes, ni le temps qu'il faut pour obtenir ces effets, ni les particularités relevées chez les animaux vaccinés et « guéris », et sur les bacilles dans les cas de guérison. Comme donnée positive sur l'action de la tuberculine sur le cobaye tuberculeux, nous ne trouvons dans les mémoires de M. Koch que ceci, c'est que les injections produisent une amélioration notable dans l'état général : « La plaie d'inoculation, ulcérée, se rapetisse et finit par se cicatriser, ce qui n'arrive jamais lorsqu'on n'a pas recours à ce genre de médication ; les ganglions lymphatiques tuméfiés diminuent ; l'état de nutrition s'améliore et le processus morbide s'arrête, s'il n'était pas trop avancé préalablement, et si l'animal ne succombe pas à l'épuisement. » Par contre, M. Koch s'étend plus longuement sur l'hypothèse qu'il a faite pour expliquer l'action de sa lymphe, et qui consiste à admettre l'existence d'une substance nécrosante dans la tuberculine. Cette substance produirait, dès son introduction dans les tissus de l'ani-

1. *The Lancet*, 1891, n° 3519, p. 300.
2. *Wratch*, 1891, n° 5, p. 144.

mal tuberculeux, des nécroses considérables du protoplasma, de sorte que les bacilles ne seraient entourés que de matériaux très défavorables à leur développement. Ne pouvant se propager que dans les tissus vivants, les bacilles perdraient leur faculté de croissance dans le milieu nécrosé et « seraient troublés dans leur végétation à tel point que leur mort surviendrait beaucoup plus facilement que dans les circonstances habituelles ».

L'insuffisance de faits précis dans les publications de M. Koch explique jusqu'à un certain point l'échec de plusieurs observateurs qui ont voulu répéter ses expériences sur la vaccination des cobayes. Ainsi, M. Jaccoud [1] rapporte l'histoire d'un cobaye qui, après avoir reçu en un mois une quantité totale de 0,5 gr. de tuberculine, non seulement ne fut pas protégé contre une inoculation de tuberculose, mais succomba avant son témoin, non traité par ce remède. Dans les expériences de M. Dujardin-Baumetz [2], exécutées avec M. Dubief, les cobayes tuberculeux traités avec des doses de 0,01 gr. à 0,02 gr. de tuberculine, ainsi que les cobayes vaccinés avec des doses de 0.01 gr. (0.1 gr. en dix jours) de cette substance, et ensuite inoculés avec le virus tuberculeux, moururent tous en même temps que les témoins. Il est évident que dans tous ces cas les doses de tuberculine, employées par les expérimentateurs, étaient trop petites pour exercer leur action d'une façon manifeste.

MM. Abraham et Crookshank [3] purent constater que les injections de tuberculine à la dose de 1 centigramme, provoquent une élévation notable de la température et une tuméfaction des ganglions chez les cobayes tuberculeux, tandis que chez les animaux sains elles ne sont suivies que d'une légère hyperthermie. Dans les expériences de M. Bardach [4], exécutées à l'Institut Pasteur, la tuberculine fournie par M. Libbertz donna une élévation très manifeste de la température chez des cobayes tuberculeux qui reçurent 0,1 gr. du liquide; les mêmes doses produisirent une hyperthermie moins accusée chez des cobayes sains. Une dose de 0,2 gr. fut mortelle pour un cobaye inoculé dans le péritoine, 41 jours auparavant, avec une culture de tuberculose; et une dose de 0,5 gr., injectée en une seule fois, a tué un cobaye tuberculeux en 48 heures. Une dose de 1,69 gr. de tuberculine ne suffit point pour préserver un cobaye contre une inoculation ultérieure avec une culture de tuberculose; tandis que des injections de 1,49 gr. réparties en 13 doses, arrêtèrent la marche de la maladie chez un co-

1. *Bulletin de l'Acad. de médecine*, 1891, n° 6, p. 225.
2. *Ibid.*, p. 226 et *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1891, n° 6, p. 113.
3. *The Lancet*, 1891, n° 3,519, p. 309.
4. Communication verbale. J'ai pu assister aux expériences de M. Bardach. V. aussi *Wratch*, 1891, p. 214.

baye, inoculé dans l'œil avec une culture tuberculeuse quatre semaines avant le commencement du traitement.

On voit, d'après ces données, que les cobayes doivent être traités par des doses beaucoup plus fortes que celles employées pour l'homme. Mais pour pousser plus loin ces expériences, il aurait fallu beaucoup plus de temps qu'il ne s'en est écoulé depuis la mise en vente des liquides; il faut donc espérer que M. Koch lui-même ne tardera pas à faire la publication circonstanciée des résultats obtenus par lui.

Pendant qu'il garde le silence sur ces détails, ce maître en bactériologie fournit des notions très importantes sur sa découverte de l'influence qu'exerce une infection tuberculeuse préexistante sur l'inoculation consécutive de cultures tuberculeuses. Contrairement à ses propres expériences, exposées dans son travail mémorable de 1884 [1], ainsi qu'aux résultats obtenus par d'autres observateurs (MM. Falk, Arloing, Charrin), M. Koch a pu constater qu'une première atteinte de la tuberculose empêche une infection secondaire par le bacille tuberculeux. Ce dernier, inoculé en culture pure sous la peau d'un cobaye tuberculeux (infecté avec succès 4 à 6 semaines auparavant), provoque une nécrose étendue de la peau, et aboutit à une élimination de l'escarre produite, sans que le bacille réussisse à se généraliser dans le corps de l'animal. Chez le cobaye sain, le même mode d'infection produit une induration ulcérée à l'endroit de l'inoculation, et permet aux bacilles de s'étendre facilement en affectant d'abord les ganglions lymphatiques.

La découverte de cette action notable d'une infection préexistante sur l'introduction ultérieure des cultures tuberculeuses, action qui se manifeste sous forme d'un phénomène typique qu'on pourrait appeler « phénomène de Koch », a été à plusieurs reprises confirmée par M. E. Roux et moi, dans nos recherches sur la tuberculose. L'oreille est surtout un endroit très commode pour l'observation de ce phénomène. Tandis que, chez le cobaye sain, l'inoculation sous-cutanée avec une culture du bacille n'est suivie que d'une faible inflammation aboutissant à la formation d'un petit abcès, chez le cobaye tuberculeux elle provoque une réaction inflammatoire intense, avec formation d'escarre qui s'élimine plus tard.

Si, au lieu de cultures de bacilles, on inocule sous la peau des crachats tuberculeux, ou bien du pus ou des parcelles d'organes de cobayes morts de la tuberculose, on constate toujours une différence notable entre les animaux tuberculeux et les témoins, quoique dans ces cas il ne se forme point d'escarres éliminables. La différence

1. *Mittheilungen des K. Gesundheitsamtes* II, 1884, p. 72.

s'observe toujours dans le même sens, c'est-à-dire que l'infection ultérieure est toujours moins grave chez l'animal déjà tuberculeux. Sous ce rapport, l'analogie avec les phénomènes connus pour l'infection syphilitique ou morveuse est indéniable.

D'un autre côté l'injection des cultures de bacilles dans l'œil de cobayes rendus tuberculeux depuis quatre semaines et plus, est suivie d'un développement de tubercules caractéristiques, sans qu'il se produise une élimination de bacilles comme dans les inoculations sous-cutanées.

L'influence réfrénatrice de bacilles tuberculeux ou de leurs produits sur une infection tuberculeuse ultérieure ne pouvant être contestée, il serait intéressant de préciser l'état dans lequel se trouvent les bacilles influencés dans le corps des cobayes. Dans les cas où l'infection secondaire est suivie de formation d'escarre, une partie au moins des bacilles introduits peut être éliminée au dehors. Il reste pourtant encore des bacilles au-dessous de l'escarre, qui non seulement ont l'aspect normal, mais sont en état de provoquer la tuberculose chez des cobayes neufs. De plus, comme chez les cobayes tuberculeux les bacilles résident surtout dans les organes internes sans communication avec l'extérieur (rate, ganglions), ces microbes doivent être empêchés dans leur action à l'endroit même de leur séjour. M. Koch ne nous renseigne malheureusement point sur cette question, et ce n'est que par voie indirecte qu'on peut conclure de ses publications que les bacilles tuberculeux restent, dans l'organisme des cobayes traités par la tuberculine, à l'état vivant et même virulent. En effet, dans les recherches faites à l'Institut Pasteur, le pus intra-oculaire des cobayes traités avec succès par la tuberculine, s'est montré contenir des bacilles tuberculeux capables de donner la maladie aux cobayes neufs.

Il s'est donc produit chez les cobayes, à la suite du traitement, quelque changement remarquable qui leur permet de résister aux bacilles tuberculeux vivants et virulents, résidant dans l'intérieur de leur organisme. D'après M. Koch, ce changement consisterait en une nécrose des tissus tuberculeux, provoquée par les produits bacillaires, nécrose qui gênerait les bacilles dans leur développement et permettrait ainsi aux cobayes de résister à leur influence. Cette hypothèse serait confirmée si, dans les organes d'animaux qui présentent le phénomène de Koch ou qui ont été traités par la tuberculine, les bacilles étaient entourés par des masses abondantes de tissus nécrosés, et par cela empêchés de nuire aux tissus vivants. Les faits ne parlent nullement en faveur de l'hypothèse de M. Koch. En étudiant ce qui se passe sous la peau de cobayes, tuberculeux depuis plus de quatre semaines, auxquels on a inoculé un peu de culture de bacilles tuber-

culeux, on peut se convaincre facilement que, dès le début, les leucocytes qui affluent en nombre considérable vers les microbes, manifestent une grande activité en entourant des masses de bacilles et en les englobant en quantité [1]. Afin de savoir si les phagocytes meurent bientôt après avoir avalé les bacilles, en fournissant ainsi des masses nécrosées, nous avons injecté, 24 heures après l'inoculation des cultures, dans le foyer inflammatoire, un peu de carmin en poudre. Quelques heures plus tard, nous fûmes en état de constater qu'un grand nombre de grains de carmin était déjà englobé par des leucocytes, dont beaucoup renfermaient en outre des bacilles tuberculeux. Donc la présence de ces derniers dans l'intérieur des phagocytes ne les empêche point de se mouvoir et d'avaler le carmin. L'examen fait 46 heures après l'injection des cultures donna le même résultat. Même après la formation d'une escarre, il reste au-dessous d'elle beaucoup de leucocytes d'apparence normale qui renferment des bacilles.

Dans les organes de cobayes tuberculeux, traités avec la tuberculine, on constate également la présence de phagocytes nombreux qui se colorent d'une façon normale, ne présentent aucun signe de dégénérescence, et renferment des bacilles tuberculeux bien colorés. On trouva notamment beaucoup de tubercules tout jeunes avec des cellules épithélioïdes et des bacilles intracellulaires, cellules et bacilles se colorant tout à fait bien, dans les organes d'un cobaye tuberculeux qui avait reçu 0,8 c. c. de tuberculine en 7 injections, et dont la mort (survenue 41 jours après l'inoculation) fut sans doute accélérée par une dernière injection de 0,2 c. c. Les alvéoles pulmonaires renfermaient des amas de macrophages (cellules à poussière) d'aspect absolument normal, dans l'intérieur desquels se trouvaient, à côté de nombreux bacilles tuberculeux, beaucoup de grains de suie englobés. Dans tous ces jeunes tubercules il n'y avait pas trace de nécrose, malgré des injections répétées du liquide de Koch. La rate et le foie renfermaient aussi un grand nombre de tubercules, dont beaucoup très jeunes, avec des cellules épithéliales normales et des bacilles bien colorés.

La théorie de l'arrêt de la maladie par suite d'une nécrose étendue, provoquée par la tuberculine, devant être abandonnée, on serait plutôt tenté d'expliquer le phénomène par une suractivité de la réaction, qui se traduit par une augmentation de l'inflammation et de la résistance des phagocytes vis-à-vis des bacilles virulents.

1. La chimiotaxie des leucocytes vis-à-vis de la tuberculine a été supposée par M. Buchner, et constatée par voie directe, par MM. Hueppe et Scholl, chez les leucocytes des lapins pour la tuberculine débarrassée de sa glycérine, et par M. Bardach chez les leucocytes des cobayes et des lapins vis-à-vis de la tuberculine originale et diluée à 10 °/₀.

III

En ce qui concerne l'influence de la tuberculine sur d'autres espèces animales, les recherches publiées jusqu'à présent ne fournissent que des renseignements provisoires. Toutefois il est fort intéressant d'apprendre que les bovidés tuberculeux présentent une hyperthermie plus accusée que les animaux sains, ce qui permettrait de diagnostiquer la maladie à un stade peu avancé, et rendrait ainsi de grands services pratiques au point de vue de la prophylaxie.

A l'Institut vétérinaire de Dorpat [1], il a été constaté que la tuberculine, aux doses de 0,1, 0,2 et 0,3 c. c, produit chez les vaches tuberculeuses une réaction fébrile qui commence à peu près 12 heures après l'injection et dure pendant quatre heures. Chez les vaches saines, les mêmes doses ne produisirent aucun effet. Dans les expériences de M. Sticker, à Cologne [2], les vaches tuberculeuses réagirent déjà 8 à 9 heures après l'injection, et présentèrent une élévation de température jusqu'à 41°.

Des doses de 0,5 c. c. de tuberculine, employées à l'École vétérinaire de Berlin, par MM. Schutz et Rœkl [3], produisirent une réaction marquée avec des températures jusqu'à 40,9 chez deux vaches tuberculeuses, mais restèrent sans effet chez une génisse saine.

Ces résultats constituent un progrès réel sous différents rapports, parce qu'un diagnostic précoce de la tuberculose des bovidés, fait le plus tôt possible, permettrait, comme le fait remarquer M. Lydtin [4], de prendre des mesures sanitaires pour combattre la tuberculose chez ces animaux, d'utiliser la viande des animaux tuberculeux tués au début de la maladie, de perfectionner l'élevage en éliminant les animaux tuberculeux, et d'empêcher l'emploi du lait de vaches tuberculeuses.

Tandis que l'emploi de la tuberculine chez les bovidés présente surtout un grand intérêt au point de vue pratique, le traitement des singes par le même remède peut fournir des renseignements très intéressants au point de vue théorique. M. Hénocque [5] communique l'histoire d'un macaque, chez lequel l'injection de tuberculine a produit d'abord une réaction caractéristique, et, employée à la dose totale de 6 milligrammes, aurait provoqué une tuberculose miliaire aiguë mortelle. A propos de cette communication, faite à la Société de

1. *Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1891, n° 3, p. 136.
2. *Deutsche medic. Woch.*, 1891, n° 7, p. 284.
3. *Ibid.* n° 8, p. 320 et *Veröffentlich. des K. Gesundheitsamtes*, n° 5, 1891.
4. *Ibid.* n° 7, p. 284, et *Thierarztliche Mittheilungen*, 1891.
5. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1891, n° 7, p. 132.

biologie, M. Capitan[1] ajouta que, dans ses expériences, un singe tuberculeux ne manifesta aucune réaction après trois doses de 1 milligramme, tandis qu'un autre singe, supposé tuberculeux, ne réagit qu'à 4 milligrammes de tuberculine. Ces recherches, si intéressantes sur la tuberculose du singe, promettent de donner des résultats importants lorsqu'elles seront menées à bout.

IV

D'après M. Koch, l'homme sain ou atteint d'autres maladies que la tuberculose ne commence à réagir par une faible élévation de température et la courbature qu'à des doses de 0,01 c. c., tandis que les tuberculeux donnent une réaction assez prononcée déjà après une injection de 0,001 c. c. Cette différence de la réaction pourrait donc rendre de grands services pour le diagnostic.

Beaucoup d'observations dirigées vers ce point prouvèrent qu'en réalité, dans le plus grand nombre des cas, les tuberculeux réagissent beaucoup plus sûrement et fortement, et à des doses beaucoup moindres que les non tuberculeux. Cependant, il a été bien démontré aussi que cette règle, quoique générale, est loin d'être absolue. D'abord, il y a un nombre considérable de tuberculeux avérés, chez lesquels la tuberculine ne provoque point ou presque point de réaction. Ce sont surtout des cas de tuberculose pulmonaire avancée qui présentent cette exception. Parmi les exemples de phtisie moyenne ne donnant pas de réaction, le plus remarquable est celui qui a été rapporté par M. Senator[2]. Il concerne une jeune dame chez laquelle 25 injections, dont 6 avec des doses de 0,02 c. c. ne provoquèrent aucune élévation de température ; même, celle de 37°,5 ne fut jamais atteinte.

D'un autre côté des personnes bien portantes, ou atteintes de maladies autres que la tuberculose, réagissent quelquefois d'une façon assez intense à des doses bien au-dessous de celle de 0,01 c. c., indiquée par M. Koch comme limite inférieure. Dans les cas observés par M. Peiper[3], parmi 19 personnes non tuberculeuses qui reçurent 0,002 c. c., quatre présentèrent de la fièvre et une réaction générale suffisamment accusée. Peut-être que, dans quelques-unes de ces exceptions, il s'agit d'une tuberculose latente qui ne put être révélée par aucun moyen diagnostic. Tel fut un cas de M. Schreiber[4], où un malade, ne présen-

1. *Ibid.*, p. 133.
2. *Berliner Klin. Woch.*, 1891, n° 7, p. 165
3. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 4, p. 160.
4. *Ibid.*, n° 8, p. 308.

tant aucun signe de tuberculose et chez lequel on supposa une neurasthénie, donna une réaction caractéristique après chaque injection; après la septième il rejeta un peu de crachats, dans lesquels furent trouvés des bacilles tuberculeux. Contre la supposition que dans toutes les exceptions à la règle, il s'agit toujours d'une tuberculose latente, il y a les élévations de température observées chez des cobayes notoirement sains après des injections de tuberculine, ainsi que des exemples de réaction locale et d'amélioration chez des malades non tuberculeux.

Le cas le plus intéressant de ce genre est celui qui a été rapporté par M. Billroth[1], et dans lequel 15 injections de tuberculine amenèrent le ramollissement d'une infiltration actinomycotique et la guérison de la maladie. M. Peiper (*l. c.*, p. 164) cite également un malade atteint de cystite consécutive à une gonorrhée, qui réagit promptement aux injections (jusqu'à 0,02cc), et chez lequel la tuberculine occasionna une amélioration surprenante dans l'état local. Les lépreux manifestent aussi une réaction à la tuberculine, qui quelquefois amène chez eux des améliorations sensibles (Goldschmidt, Babes et Kilendero, etc.).

Malgré toutes ces exceptions, la règle générale persiste, de sorte qu'il est incontestable que, dans beaucoup d'occasions, la tuberculine peut rendre des services importants. Ainsi, les injections de ce liquide ont permis à M. Schreiber (*l. c.*, p. 308), de constater que des enfants issus de parents tuberculeux sont déjà atteints d'une tuberculose locale, notamment de ganglions, dans une période où leur état de santé ne laisse rien à désirer. D'un autre côté, le même observateur a établi que les nouveau-nés (dont il a examiné 40), sont extraordinairement insensibles à la tuberculine; même des doses allant jusqu'à 0,05cc, ne produisent chez eux aucune trace de réaction. Ce fait remarquable démontre que la tuberculose congénitale n'est pas la règle, et que ce n'est qu'à un certain âge que les enfants acquièrent la maladie.

V

En parlant de l'effet de son remède sur l'homme, M. Koch insiste pour que l'on commence, autant que possible, les recherches par le traitement des lupus. De très nombreux observateurs ont confirmé l'exactitude de la description de la réaction locale, faite par M. Koch dans les termes suivants : « Quelques heures après l'injection faite

1. *Wiener medicinische Presse*, 1891, nº 9, p. 350.

sous la peau du dos, c'est-à-dire en un point bien éloigné des parties atteintes, les régions lupeuses commencent — d'ordinaire même avant la manifestation du frisson — à gonfler et à rougir. Pendant la fièvre, le gonflement et la rougeur augmentent de plus en plus, et cet état arrive même au point que le tissu lupeux présente une couleur brun-rouge et devient nécrotique. Si les foyers lupeux sont plus limités, on voit que la région, fortement tuméfiée et d'un brun-rouge, est entourée d'une auréole blanchâtre d'une largeur de près de 1 centimètre, qui à son tour est entourée d'une zone rouge vif. Après l'abaissement de la température, la tuméfaction des régions lupeuses diminue peu à peu, de telle sorte qu'elle peut avoir disparu au bout de 2 ou 3 jours. Les foyers lupeux eux-mêmes sont couverts de croûtes formées d'un sérum s'écoulant en gouttes et se séchant à l'air; elles se transforment en escarres qui se détachent spontanément au bout de 2 à 3 semaines, et présentent, parfois déjà après une seule injection du liquide, une cicatrice lisse et rouge. En général, il faut cependant plusieurs injections pour obtenir ce résultat. Un point à noter, c'est que dans ce processus les altérations décrites sont exclusivement limitées aux régions atteintes de lupus; les plus petites nodosités, presque invisibles et cachées dans le tissu cicatriciel, prennent même part à ce processus et deviennent visibles par suite du gonflement et du changement de couleur, tandis que le tissu cicatriciel proprement dit, dans lequel les processus lupeux se sont terminés, ne subit aucun changement. » (2me Mémoire de M. Koch.) Ce tableau typique a pu être observé après des doses de 0,01 c. c., qu'on injectait aux lupiques adultes dans les premiers cas étudiés par M. Koch et un grand nombre d'autres observateurs.

Les exemples de lupus véritable ne présentant pas de réaction après les injections sont extrêmement rares. Je ne citerai qu'un cas des plus marqués. M. J. Israel [1] a observé un malade lupique, atteint en même temps d'une tuberculose pulmonaire, qui, malgré des doses allant jusqu'à 0,1 c. c. et malgré une quantité totale de 0,896 c. c. de tuberculine injectée, ne manifesta ni réaction locale, ni amélioration de l'affection lupeuse. Néanmoins, l'examen microscopique d'un morceau excisé démontra la présence de tubercules et de cellules géantes typiques.

Même en se servant de doses beaucoup plus faibles, comme on le fait maintenant, afin d'éviter les accidents, on obtient une réaction assez marquée et quelquefois même très forte. Ainsi M. Blaschko [2] obtint une réaction locale très prononcée après avoir injecté des

1. *Berliner klinische Wochenschr.*, 1891, n° 4, p. 113.
2. *Ibid.*, n° 9, p. 235.

doses de 2 déci-milligrammes. M. Hallopeau [1] a constaté qu'un demi-millième de c. c. suffit souvent à élever la température à plus de 40°; chez plusieurs sujets il a obtenu une réaction suffisante même avec un quart de millième.

Tous les observateurs sont unanimes à reconnaître l'amélioration produite par la tuberculine dans beaucoup de cas de lupus. Quelquefois même on a pu constater une guérison, qui s'est maintenue pendant un temps assez long. Ainsi M. Esmarch [2] a obtenu une guérison définitive dans un cas de lupus du nez, compliqué d'excroissances adénoïdes de la cavité nasopharyngienne, avec suppression totale de la respiration nasale. Une quantité totale de tuberculine de 0,86 c. c. a suffi pour faire complètement disparaître le lupus et pour rétablir la respiration par le nez. Tout récemment, M. Billroth [3] a mentionné la disparition totale d'une infiltration lupique de la lèvre supérieure après un traitement de trois semaines par la tuberculine.

Les lupiques qui ont été le plus longtemps observés sont les trois malades de M. Levy [4], dont le traitement fut commencé en octobre 1890, sous la direction de M. Koch même. Les doses employées étaient parmi les plus grandes qui aient été administrées (jusqu'à une quantité totale de 2,5 gr.), et la réaction était des plus prononcées. Dans ces conditions, l'amélioration a été très frappante et nette. Malheureusement, depuis la première communication du mois de novembre 1890, M. Levy n'a point donné de renseignements nouveaux sur le sort de ses malades, et ce n'est que par voie indirecte que nous apprenons [5] que l'un d'eux a donné une récidive après la dixième injection.

Sous ce rapport on est mieux informé sur la marche du traitement des malades lupiques de M. Bergmann [6], dont le traitement a été commencé au mois de novembre dernier, et chez lesquels par conséquent la période d'observation a été des plus longues. Parmi les premiers malades, l'attention fut surtout attirée sur un nommé Klingbeil, atteint de lupus exfoliatif et exulcérant du nez, des joues et de la lèvre supérieure, avec disparition de la cloison et des ailes du nez. Les injections de 0,01 c. c. de tuberculine furent suivies d'une réaction intense, et l'amélioration, après la quantité totale de 0,05 c. c., fut telle que M. Bergmann exprima « l'assurance certaine que mêmes les dernières traces de la maladie, consistant en exfoliation et rougeur, disparai-

1. *Semaine médicale*, 1891, n° 8, p. 59.
2. *Deutsche medic. Wochensch.*, 1891, nos 3 et 4, p. 103 et 172.
3. *Wiener medicin. Presse*, 1891, n° 9, p. 351.
4. *Deut. med. Woch.*, 1890, n° 47, p. 1056.
5. *Wiener medic. Presse*, 1890, n° 50, p. 1993.
6. *Deutsche medic. Woch.*, 1890, n° 87, p. 1073.

traient prochainement ». Le traitement fut poursuivi [1] jusqu'au 8 janvier 1891, s'étendant ainsi à 53 jours; la quantité totale de la tuberculine s'éleva à 0,87 c. c. Mais, malgré la disparition des réactions et l'amélioration mentionnée, la réaction générale et locale réapparut, plus de deux mois après le commencement du traitement, à un tel degré qu'il se forma de nouvelles croûtes. Les mêmes phénomènes furent notés dans beaucoup d'autres cas de lupus, de sorte que la plupart des observateurs ne parlent plus de guérisons définitives, et mentionnent souvent la réapparition de tubercules lupiques sur les endroits qui paraissaient être guéris. Ainsi M. Hutchinson [2] a vu, malgré la réaction caractéristique et une amélioration incontestable, des résidus de tubercules persister sur les bords de la peau affectée, et constata une telle récidive dans un cas, considéré d'abord comme guéri, que l'amélioration était nulle.

M. Schwimmer [3] à Budapest, résumant ses observations sur le traitement du lupus, affirme que malgré des améliorations notables, la guérison définitive ne put être obtenue, parce que les tubercules profonds, résidant dans le derme, restèrent intacts après le traitement.

Les dermatologistes de l'hôpital de Saint-Louis, MM. Besnier et Hallopeau [4], qui entreprirent le traitement sur plusieurs dizaines de malades, mais opérèrent avec des doses beaucoup moindres que celles employées en Allemagne, remarquèrent que non seulement les tubercules anciens ne disparurent pas, mais qu'il se forma encore de nouveaux tubercules pendant le traitement. Malgré l'amélioration observée dans un certain nombre de cas, elle n'a été nulle part « assez éclatante pour être considérée comme une guérison, même temporaire ».

La diminution des doses, comparativement à celles employées au début par M. Koch et ses collaborateurs, s'explique par les complications et les accidents produits par la tuberculine. On observa dans beaucoup de cas des troubles du côté des reins (albuminurie, hématurie), du cœur (accélération et faiblesse) et d'autres organes. Dans le lupus, compliqué par d'autres affections tuberculeuses, on a même vu, dans des cas très rares il est vrai, la mort survenir à la suite des injections de tuberculine. Ainsi une jeune fille de 17 ans, atteinte d'un lupus exulcérant de la face, a succombé à la suite d'une seule injection de 0,002 c. c., et à l'autopsie, relatée par M. Jarisch [5], on a

1. *Deutsche medic. Wochens.*, 1891, n° 6, p. 242.
2. *British medical Journal*, 31 janv.
3. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 1, p. 37.
4. *Semaine médicale*, 1891, n° 8, pp. 54-60.
5. *Wiener Klinische Wochensch.*, 1890, n° 50.

trouvé une tuberculose des ganglions et de l'intestin, de l'infiltration et de l'œdème pulmonaire, ainsi que de l'œdème du cerveau et de la moelle, des ecchymoses de la plèvre et du péricarde, etc. Plus démonstratif encore est un cas observé par M. de Burckhardt [1], concernant une fille de 23 ans, atteinte d'un lupus assez étendu du nez, du palais, de la paroi postérieure du pharynx ainsi que de la jambe droite. Après avoir réagi de la façon habituelle à deux injections de 0,005 et 0,008 c. c., cette malade succomba 22 heures après une troisième injection de 0,01 c. c. avec une néphrite interstitielle aiguë, sans lésions tuberculeuses autres que le lupus.

Après des avertissements de ce genre, les doses de tuberculine furent partout de beaucoup diminuées, ce qui supprima les accidents, mais diminua en même temps l'intensité de la réaction et le degré de l'amélioration.

Les recherches histologiques sur le lupus traité par la tuberculine démontrèrent avant tout la production d'une inflammation exsudative très forte, due incontestablement aux injections. Tous les observateurs de ces phénomènes, depuis M. Kromayer [2], qui donna la première description microscopique du tissu lupeux pendant la période de la réaction, jusqu'à M. Schimmelbusch [3], qui a pu étudier très soigneusement 30 cas de tuberculose traités par la tuberculine, sont unanimes à déclarer qu'au lieu de la nécrose, supposée par M. Koch, le tissu tuberculeux ne subit qu'une inflammation très active, accompagnée d'une infiltration leucocytaire, ainsi que d'une imprégnation par un exsudat séreux et fibrineux. Dans la période aiguë de la réaction, l'épiderme devient vacuoleux à la suite d'une transsudation abondante; un nombre plus ou moins considérable de leucocytes traverse la couche épidermique, et il arrive souvent que cette dernière éclate pour faire passage à l'exsudat qui se solidifie en donnant les croûtes tant de fois décrites dans le processus du traitement du lupus.

Mais, malgré cette inflammation aiguë, les tubercules restent intacts, et si quelques-uns situés plus superficiellement sont éliminés, comme dans les cas de lupus exulcéré, un grand nombre d'autres, logés dans la profondeur du derme, résistent, sans présenter de signes de nécrose ou de dégénérescence. Voici comment M. Schimmelbusch résume ses recherches histologiques. « Ni au centre, ni à la périphérie des tubercules on n'a pu voir de nécrose en général ou de nécrose de coagulation en particulier, comme l'a supposé M. Koch au sujet de

1. *Deutsche medic. Woch.*, 1891, n° 3, p. 134.
2. *Ibid.*, 1890, p. 1138.
3. *Ibid.*, 1891, n° 6, p. 240. V. aussi Riel, *Wiener Klin. Wochenschr.*, 1690, n° 51, et Jacobi, *Centralbl. f. allg. Pathologie*, 1890, t. II, n° 2.

l'action de son remède. Les cellules épithélioïdes présentèrent leur aspect habituel, leur noyau était pauvre en chromatine comme d'habitude; mais le nucléole et les filaments nucléaires furent nettement accusés; par contre on ne fut en état de constater ni un processus karyolytique, comme on en voit au début de la nécrose, ni un morcellement du noyau. »

L'examen histologique, démontrant la persistance des tubercules malgré le traitement, prouve donc que ce dernier n'a point amené une guérison définitive. Dans le cas de Klingbeil, mentionné ci-dessus, l'examen histologique d'un nodule, extirpé par M. Schimmelbusch, a permis de prédire la rechute, qui fut constatée plus tard à la clinique de M. Bergmann.

Aux cas déjà décrits, nous pourrions en ajouter encore deux autres provenant du service de M. Quinquaud, à Saint-Louis. L'étude des pièces extirpées avant le traitement, dans la période de la réaction et six semaines après le début du traitement (injection de 0,01 c. c. en 4 doses), démontrèrent une infiltration de la peau par des cellules rondes, et la persistance des cellules épithélioïdes et géantes avec leur structure habituelle, sans aucune trace de nécrose ou dégénérescence. Dans un des deux cas (lupus fermé), nous trouvâmes dans les cellules tuberculeuses, après six semaines de traitement, quelques bacilles à contours nets, fortement colorés, et en général ne se distinguant en rien des bacilles tuberculeux normaux.

VI

Nous avons insisté plus longuement sur les résultats obtenus pour le lupus, parce que cette affection tuberculeuse se présente comme la plus favorable pour le traitement par la tuberculine, et pour l'étude des phénomènes réactionnels et histologiques. La facilité d'examiner la structure de tubercules extirpés sur le vivant, exclut les objections qui se soulèvent contre les résultats obtenus sur le cadavre pour les organes internes. Nous pouvons, par contre, être beaucoup plus brefs sur ce qui concerne la tuberculose chirurgicale, d'autant plus qu'ici les données sont en général moins précises et concordantes.

Comme le dit M. Mikulicz [1] dans son rapport qui vient de paraître, « il est encore impossible pour le moment de porter un jugement définitif sur la valeur thérapeutique du remède de Koch dans la tuberculose chirurgicale. » A côté d'une amélioration manifeste qu'on observe dans un grand nombre de cas, dans d'autres l'état stationnaire

1. *Deutsche med. Woch.*, 1891, nº 10, p. 373.

persiste, ou il survient même une aggravation plus ou moins marquée. Ainsi, M. Esmarch [1] a pu constater, d'un côté, un cas de guérison très prompte des fistules formées après l'extirpation des ganglions cervicaux et plusieurs cas d'amélioration notable, et d'un autre côté il a observé des cas récalcitrants qui ne manifestèrent aucune tendance vers la guérison après un traitement forcé par la tuberculine.

M. Mikulicz, de son côté, a obtenu la guérison dans un cas de tuberculose des os et des articulations; dans plusieurs autres il observa une amélioration notable, tandis que dans une troisième catégorie de cas comprenant la moitié de ses malades (14 sur 28), aucun changement ne put être constaté.

Des études microscopiques de cas de tuberculose chirurgicale furent faites par O. Israël [2], à qui l'on doit en général les premiers renseignements positifs sur le tableau histologique de l'effet de la tuberculine, et qui constata, dans le tissu de la paroi d'un abcès périarticulaire recouvert d'une couche nécrosée, des cellules géantes, des cellules appelées *Mastzellen*, et un assez grand nombre de leucocytes. Le contenu de cet abcès, puisé après 5 semaines de traitement, lorsque la tuberculine ne donna plus de réaction, et inoculé dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, provoqua la formation de tuberculose de l'iris. Cette expérience confirme donc l'assertion de M. Koch que son traitement laisse les bacilles tuberculeux à l'état vivant et virulent.

Dans une cicatrice cervicale, provenant d'une extirpation antérieure des ganglions et qui réagit à la tuberculine, M. O. Israël a pu également constater la présence de cellules géantes d'aspect normal, ainsi qu'une infiltration considérable par des leucocytes.

VII

Les affections tuberculeuses de la cavité buccale présentent un intérêt tout particulier dans la question qui nous préoccupe, parce que les phénomènes qui se passent dans les muqueuses sont les plus faciles à étudier. Dans plusieurs cas on a vu les ulcérations tuberculeuses, après avoir présenté une réaction intense à la tuberculine, se guérir promptement; d'autres fois on a vu, au cours du traitement, l'apparition de tubercules qui se résorbèrent après des injections répétées. Ainsi, chez un malade de M. O. Brieger [3], la langue ne présentait avant le traitement qu'une surface irrégulière et mamelonnée, mais

1. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 4, pp. 167-172.
2. *Berliner Klin. Wochensch.*, 1890, pp. 1127 et 1891, ch. 1, p. 8.
3. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 5, pp. 202-204.

se tuméfia après la première injection et se couvrit d'ulcères plats. A la suite de trois autres doses de tuberculine, les ulcères se détergèrent et guérirent très promptement, laissant des cicatrices. En renouvelant les injections après un intervalle assez long, la réaction ne se produisit point, de sorte que le malade put être considéré comme réellement guéri. Dans tous ses autres cas, M. O. Brieger ne put obtenir qu'une guérison partielle et des améliorations manifestes.

D'un autre côté on a observé des malades chez lesquels la tuberculose de la cavité buccale ne se manifesta que pendant le traitement, en accusant une marche progressive. M. A. Fränkel [1] montra à la Société médicale de Berlin un malade atteint de phtisie pulmonaire d'un degré moyen, chez lequel une affection tuberculeuse de la langue ne se manifesta que 18 jours après la première inoculation. Malgré la continuation du traitement, l'affection de la langue s'aggrava, et il se forma une ulcération profonde, contenant un grand nombre de bacilles tuberculeux. A peu près six semaines après le commencement des injections, il se forma, à une certaine distance de l'ulcère, des tubercules miliaires et submiliaires, dont le développement put être suivi de jour en jour. Cette observation prouve de la façon la plus nette que la tuberculose peut continuer son évolution pendant et malgré le traitement le plus prolongé.

Un cas, étudié par M. Schimmelbusch [2], confirme cette conclusion à l'aide d'un examen histologique. Il s'agit d'un malade atteint d'une tuberculose du palais, chez lequel le traitement prolongé pendant 47 jours, avec une quantité totale de 0,89 c. c. de tuberculine, fut suivi d'une aggravation de l'ulcération. L'étude microscopique d'une portion d'ulcère excisé démontra la présence de tubercules nombreux et intacts, contenant une grande quantité de cellules géantes et de bacilles tuberculeux, et ne présentant aucun signe de nécrose.

VIII

Il n'est point possible de donner pour le moment un aperçu tant soit peu complet et exact du nombre infini de recherches qui ont été faites sur le traitement de la tuberculose des voies respiratoires. Malgré toutes les divergences d'opinions, et le passage brusque d'un optimisme trop exalté à une négation trop absolue, on voit qu'à mesure

1. *Berliner Klin. Woch.*, 1891, n° 3, p. 79. Un cas analogue a été observé par M. Litten. *Ibid.*, 1890, p. 1171.
2. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 6, p. 243.

que l'expérience augmente, on est d'accord pour diminuer de beaucoup les doses injectées, et pour restreindre de plus en plus le nombre de cas indiqués pour le traitement. Sous le premier rapport nous devons citer MM. Gutmann et Ehrlich[1] qui font le traitement à l'hôpital Moabit sous la direction de M. Koch, et qui, dans beaucoup de cas, ne commencent les injections qu'avec 0,0001 c. c. pour atteindre au bout de 10 jours la dose de 0,001 c. c., avec laquelle on commençait autrefois le traitement de la phtisie pulmonaire. Malgré ces faibles doses, il suffit d'une quantité de 0,0001 à 0,0002 de tuberculine pour provoquer une réaction locale du larynx et quelquefois même d'autres organes tuberculeux, tels que les ganglions et autres.

Au début on appliquait le traitement à tous les tuberculeux poitrinaires sans grande distinction. A présent on le limite autant que possible. MM. Gutmann et Ehrlich excluent les malades qui manifestent une réaction fébrile prononcée après des doses de 0,0001 ou 0,0002 c. c. La phtisie avancée, l'hémophtisie, le diabète, les affections cardiaques sont autant de contre-indications. M. Lichtheim[2] refuse même le traitement aux malades atteints de phtisie pulmonaire depuis des années, chez lesquels le mal s'est arrêté et qui se sentent assez bien, malgré des lésions prononcées et la présence des bacilles dans leurs crachats. M. Lichtheim invoque comme raison le fait « que l'amélioration qui pourrait être provoquée par le traitement est trop insignifiante vis-à-vis du risque que peuvent courir de semblables malades. — Car il n'y a pas de doute qu'ils risquent que leur état, satisfaisant pour le moment, ne s'aggrave d'une façon durable à la suite du traitement ».

Des améliorations plus ou moins considérables ont été constatées dans un grand nombre de cas et par la plupart des observateurs. Mais l'assertion de M. Koch[3] que tous les malades traités au début de la phtisie guérissent dans une période de 4 à 6 semaines, et que par conséquent « la phtisie au début est sûrement guérie par le traitement », ne s'est réalisée que dans une faible mesure. A l'hôpital de Moabit, où le traitement se fait sous la direction de M. Koch lui-même, et où on a un grand choix de malades, on n'a pas encore obtenu de guérison de la phtisie pulmonaire. M. P. Gutmann[4], qui a donné un rapport succinct, ne parle que d'améliorations plus ou moins notables, même dans les cas du début; sur 51 malades à cette période initiale, 41 ont présenté ces améliorations. Comme cas de guérison véritable, on cite toujours les deux malades mentionnées par M. Koch dans son dernier mémoire, e

1. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 10, p. 373.
2. *Ibid.*, 1891, n° 7, p. 276.
3. *Ibid.*, 1890, n° 46, *a*, p. 1032.
4. *Berliner Klin. Woch.*, 1891, n° 3, p. 83.

citées aussi par MM. Gutmann et Ehrlich[1]. Une d'elles, E. Thiel, âgée de 17 ans, a eu, depuis 1889, 9 fois des hémophtisies avec infiltration des deux sommets et des bacilles dans les crachats. Traitée depuis le 30 septembre avec la tuberculine, tous les symptômes disparurent et la malade reprit son air florissant. Une autre malade, B. Lichtenberg, âgée de 25 ans, poitrinaire depuis deux ans, avec une infiltration du sommet gauche, descendant jusqu'à la troisième côte, fut aussi complètement guérie après un traitement commencé le 1er octobre. Ces cas importants n'ont pas été encore décrits avec des détails suffisants pour que l'on porte un jugement définitif sur leur signification. En dehors d'eux, il n'y a que peu de données sur une guérison durable de la phtisie à la suite du traitement par la tuberculine. On a plusieurs fois observé la disparition des bacilles dans les crachats, mais tantôt ils réapparaissaient de nouveau[2], tantôt il s'agissait de petits foyers qui évacuèrent des bacilles à la suite des injections et se refermèrent.

Tout le monde accepte à présent que, dans la phtisie avancée, la tuberculine est contre-indiquée, comme pouvant occasionner une aggravation redoutable. Mais, tandis que les champions zélés de la nouvelle méthode affirment que dans les cas de phtisie, au début, il n'y a rien à craindre, d'autres citent des cas où la maladie, quoique peu avancée au début du traitement, s'aggrava brusquement à la suite des injections. Parmi les exemples de ce genre, je n'en mentionnerai que deux.

M. Naunyn [3] cite un garçon de 18 ans, bien nourri, mais atteint d'un catarrhe initial du sommet. Après deux injections il se déclara une fièvre de plus en plus intense, et le malade mourut à la suite d'une tuberculose miliaire aiguë toute fraîche, qui fut constatée à l'autopsie.

Voici le second exemple. A la fin de novembre 1890 entra à l'hôpital israélite de Berlin un étudiant de 25 ans, robuste et fort, sans autres signes morbides qu'une faible matité du sommet gauche. Les crachats renfermaient de nombreux bacilles. Après neuf injections, pratiquées pendant trois semaines, le malade, qui se distinguait par son embonpoint, éprouva de la difficulté à respirer et présenta une accélération surprenante du pouls. Dès lors la fièvre s'établit, la maladie prit une marche aiguë, et le malade succomba à la suite d'une perforation de la plèvre et d'une tuberculose généralisée[4].

Ce cas a été étudié au point de vue de l'anatomie pathologique par M. Virchow[5] qui constata « une perforation rapide de la plèvre avec

1. *Berl. Klin. Woch.*, 1891, n° 7, p. 180.
2. P. ex. dans les cas de M. Openheim., *Berl. Klin. Woch.*, 1891, n° 3 p. 56.
3. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 9, p. 342.
4. *Berl. Klin. Woch.*, 1891, n° 3, p. 83.
5. *Ibid.*, 1891, n° 3, p. 82.

formation de pneumothorax par suite de l'application du remède ou au moins après celle-ci ». M. Virchow fit voir en outre un assez grand nombre d'autres cas où, malgré les injections de tuberculine, répétées même un grand nombre de fois, la tuberculose prit une marche aiguë et finit par amener la mort. Tout dernièrement [1] il autopsia un individu chez lequel une tuberculose submiliaire aiguë, répandue sur un grand nombre d'organes, enleva le malade un mois après le commencement du traitement. Le développement des tubercules put être suivi dans le larynx durant les derniers jours de la vie du malade.

Dans un autre cas [2], traité pendant plus de deux mois, l'autopsie révéla à côté « d'une affection très restreinte d'un sommet, qu'on peut considérer comme plus ancienne, toute une série d'altérations caséeuses et ulcéreuses fraîches qui, évidemment, ont dû se produire pendant la période des injections ».

En dehors de la dissémination des tubercules, M. Virchow [3] observa, à la suite des injections, des phénomènes inflammatoires très graves, entre autres une pneumonie ressemblant à la pneumonie catarrhale, et caractérisée par une infiltration trouble des alvéoles, l'aggravation des pleurésies qui accusèrent un caractère hémorragique, et la tendance des ulcérations à s'aggraver et à perforer, comme cela a été plusieurs fois constaté pour les ulcérations tuberculeuses des intestins.

En ce qui concerne les propriétés des tubercules soumis au traitement, M. Virchow [4] insiste sur leur résistance et sur le manque de phénomènes de nécrose autres que ceux qu'on observe habituellement. Les bacilles mêmes ne subissent point de changements notables, restant vivants et virulents. Les tubercules ne se résorbent point et n'accusent aucune tendance à s'indurer et à s'encapsuler plus facilement que sans le traitement. Tout au contraire, il est probable que sous l'influence des injections, « des masses auparavant encapsulées peuvent être mobilisées, de sorte qu'un foyer qui paraissait inoffensif, devient un danger sérieux pour le malade. » D'après M. Virchow, ce ne sont pas les tubercules eux-mêmes, mais plutôt le tissu environnant qui

1. *Berliner Klin. Woch.*, n° 9, p. 237.
2. *Ibid.*, n° 8, p. 213.
3. *Ibid.*, n° 2, p. 49-52.
4. M. Frantzel et plusieurs autres observateurs ont supposé d'abord un changement morphologique et considérable des bacilles, occasionné par la tuberculine. Des recherches ultérieures ont montré que ces changements ne présentent rien de spécifique, et s'opèrent aussi en dehors de toute action du remède.

D'un autre côté, M. Liebmann a avancé que, sous l'influence du traitement, les bacilles tuberculeux pénètrent dans le sang et peuvent y être retrouvés facilement. Les recherches de MM. Ewald, Gutmann et Ehrlich, Hlava, et autres ont réfuté l'assertion de M. Liebmann.

subit l'action la plus accusée, en s'inflammant à la suite des injections.

M. Kromayer [1] poursuit cette idée plus loin, en l'appliquant à une théorie de l'action thérapeutique de la tuberculine. Plus un tubercule est entouré de vaisseaux (comme dans le lupus), plus il est accessible à cette action, qui faciliterait la cicatrisation autour de lui. Voilà pouquoi les plus jeunes et les plus vieux tubercules sont les moins influencés par le remède, les premiers n'étant pas encore entourés de vaisseaux, les autres ayant déjà perdu leur entourage vasculaire.

M. Rindfleisch [2] qui a étudié le processus curatif des ulcérations intestinales dans un cas de tuberculose interne, traité pendant deux mois par le remède de M. Koch, attribue l'effet thérapeutique à une action assainissante du liquide, qui empêche les bacilles de nuire aux tissus granuleux, permettant par suite à ce dernier de suivre son évolution normale et de se transformer en tissu conjonctif.

Malgré une certaine divergence d'opinion, tous les auteurs qui ont fait une étude histologique sur le sujet, M. Rindfleisch aussi bien que M. Kromayer et tant d'autres observateurs mentionnés déjà dans cette revue, sont unanimes à déclarer que les phénomènes de nécrose ne sont nullement provoqués par la tuberculine d'une façon plus accusée que d'habitude. Tous au contraire, ils affirment la présence de cellules tuberculeuses (épithélioïdes et géantes) normales dans les tubercules, qui ont été pendant longtemps exposées à l'action du remède. M. Rindfleisch dit que dans les ulcères intestinaux guéris, ainsi que dans des cas de guérison de tuberculose pulmonaire ou péritonéale, les cellules géantes présentent un attribut très constant dans toutes ces néoplasies, dans les florissantes aussi bien que dans les anciennes, et paraissent facilement survivre aux bacilles qu'elles renfermaient au début [3].

L'examen des phénomènes qui se passent sous l'influence de la tuberculine dans l'organisme humain, aussi bien que dans le corps des cobayes, dans la tuberculose de la peau et des muqueuses, aussi bien que dans celle des organes parenchymateux, démontre d'une façon évidente que la théorie de l'action nécrosante de la tuberculine ne peut être acceptée. Au lieu d'augmenter la nécrose des tissus tuberculeux, la tuberculine les met dans un état de suractivité qui facilite leur résistance vis-à-vis de l'agent morbide.

Il y a lieu de s'étonner que tous les observateurs cités, qui ont établi par une étude soignée les données que je viens de résumer, ne

1. *Deutsche med. Woch.*, 1891, n° 8, p. 305.
2. *Ibid.*, n° 6, p. 236.
3. *L. c.*, p. 238.

disent pas un seul mot au sujet des phagocytes, dont le rôle est cependant tout à fait frappant dans les phénomènes qui nous intéressent. Comme il a été démontré plus haut à propos des cobayes, les bacilles tuberculeux, pendant le phénomène de Koch, ainsi qu'après les injections du remède, restent emprisonnés dans l'intérieur des phagocytes, qui présentent tous leurs caractères normaux, et dont l'état vivant et actif est démontré par la facilité avec laquelle ils englobent le carmin. Il s'agit donc d'une suractivité des phagocytes, occasionnée par la tuberculine. Cette suractivité se traduit par une leucocytose générale, qui a été constatée par plusieurs observateurs, par des phénomènes considérables de chimiotaxie et par la résistance plus grande des cellules tuberculeuses — qui sont toutes des phagocytes — vis-à-vis de l'action nuisible des bacilles tuberculeux.

N'étant point capables de détruire ces microbes munis d'une enveloppe très dure, les phagocytes, sous l'influence du remède, parviennent à les gêner dans leur développement et à empêcher leur action destructive. Des phénomènes semblables s'observent également dans les cas de résistance naturelle de certains animaux, des rats par exemple, chez lesquels les bacilles restent vivants pendant un temps très long, mais, englobés dans les phagocytes, sont impuissants à nuire à l'organisme. Nous retrouvons un fait analogue avec les spores charbonneuses qui, pendant des mois, restent englobées dans les phagocytes d'animaux résistants, sans être tuées; mais aussitôt que l'animal sera brusquement placé dans des conditions défavorables, qui empêchent les phagocytes de continuer leur action inhibitoire, les bacilles germeront dans l'intérieur de ces cellules mêmes et envahiront l'organisme entier [1]. Il est tout naturel que les phagocytes, incapables de tuer les bacilles tuberculeux qu'ils renferment, puissent devenir un des moyens de propagation de ces microbes dans l'organisme et, dans des conditions où la résistance des cellules serait amoindrie, engendrer une tuberculose disséminée.

Il va sans dire que l'action phagocytaire dirigée contre le bacille tuberculeux, si manifeste qu'elle soit, ne peut être considérée comme un phénomène tout à fait indépendant de toutes autres influences. Ainsi il est évident que l'inflammation active autour des phagocytes doit exercer une influence sur leur nutrition, et les stimuler peut-être d'une façon toute spéciale. Mais, malgré tout, on a le droit de supposer que l'organisme traité se défend, non point par une couche de tissu mortifié, qui tiendrait le bacille à distance, mais bien par

1. Les faits sur lesquels est basée cette conclusion au sujet des spores charbonneuses ont été constatés par M. Trapeznikoff, et vont être publiés dans ces *Annales*.

l'intermédiaire des phagocytes vivants, qui gêneraient le microbe. Dans la nature il existe des cas d'une résistance encore plus parfaite. Ainsi les cellules géantes et parfois épithélioïdes des spermophiles (animaux peu sensibles à la tuberculose) parviennent à tuer le bacille tuberculeux, d'ordinaire si tenace, et à le transformer en une masse dégénérée et inerte. Cette action qui a été, à un moindre degré il est vrai, observée aussi chez le lapin et même rarement chez le cobaye, est due sans doute à la production par les phagocytes d'une substance particulière très active qui tue et transforme le bacille [1]. C'est vers ce but que doit tendre tout remède vraiment radical contre la tuberculose.

IX

1° En résumant cet aperçu, nous devons insister d'abord sur l'importance de la découverte de l'action d'une affection tuberculeuse préexistante sur une introduction ultérieure du virus, et sur celle d'une substance capable d'entraver la marche de la tuberculose chez les cobayes et d'améliorer la tuberculose humaine. Quoique cette découverte, due à M. Koch, n'ait point été faite dans une direction absolument nouvelle, mais bien dans la voie des recherches de l'action vaccinante des produits microbiens, elle n'en servira pas moins à approfondir l'étude du fléau le plus terrible du genre humain, et à faciliter la lutte contre lui. Elle constitue le pas le plus considérable fait encore dans cette voie, et si elle n'a pas encore tenu tout ce qu'elle avait promis, on peut dire en revanche qu'elle promet beaucoup plus qu'elle n'a encore tenu;

2° Le bacille n'est point directement atteint par la tuberculine, puisqu'il conserve sa virulence, mais il est empêché dans son action nuisible par une suractivité des tissus tuberculeux en général et des phagocytes en particulier;

1. V. mon mémoire sur l'action phagocytaire dans la tuberculose dans les *Archives de M. Virchow*, juillet 1888.

L'exemple de la tuberculose nous montre bien que M. Koch a eu tort de se prononcer aussi nettement contre le rôle des phagocytes, qu'il l'a fait dans son discours au Congrès de Berlin, le 4 août 1890. Il y a du reste un malentendu dans son assertion que, dans l'immunité, ce ne sont point les phagocytes, « mais très probablement les phénomènes chimiques qui jouent le rôle principal ». (*Ueber bacteriologische Forschung*, 1890, p. 10.) L'action phagocytaire, dans laquelle entrent les phénomènes de digestion intracellulaire, se compose, entre autres éléments, d'influences de substances chimiques produites dans les phagocytes. Ces derniers s'approchent des microbes par un effet de leur sensibilité, les englobent par suite de leur propriété amiboïde, et les tuent à l'aide de substances contenues dans leur intérieur. Le dilemme de M. Koch, — action phagocytaire ou action chimique, — ne serait donc point justifié.

3° La valeur diagnostique de la tuberculine peut rendre des grands services à l'étude de l'évolution et de la propagation de la maladie, à la prophylaxie de la tuberculose humaine et à l'agriculture;

4° La tuberculine, beaucoup plus dangereuse pour l'homme que pour le cobaye, ne peut donner l'immunité au premier. Injectée avec une grande prudence, elle produit des améliorations incontestables dans différentes affections tuberculeuses, notamment dans celles de la peau. Comme il n'est plus possible d'assurer qu'une guérison complète puisse se produire en 4 à 6 semaines, il est indispensable de prolonger les observations cliniques;

5° Dans le but d'aboutir à une connaissance plus complète des choses, il est indispensable de continuer des recherches expérimentales variées sur plusieurs espèces animales. Il serait donc urgent que M. Koch publie des données plus détaillées sur ses expériences avec les cobayes, ainsi que sur la préparation de la tuberculine.

EL. METCHNIKOFF.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de la rage.

TERLES BARTHÉLEMY, 59 ans, forgeron à Saint-Sixte (Lot-et-Garonne). Mordu le 1er janvier 1891 par un chien reconnu enragé, d'après les renseignements recueillis et à l'autopsie, par M. Bresque, médecin vétérinaire à Valence-d'Agen.

Terles présente sur le bord interne de la 1re et de la 2e phalange du pouce gauche une morsure par éraflure, assez pénétrante, longue de 2 centimètres et demi, ayant bien saigné. Il s'est cautérisé lui-même au fer rouge 3 heures après l'accident.

Terles a subi le traitement à l'Institut Pasteur du 5 au 19 janvier.

Il tombe malade le 1er février et succombe à la rage le 8 février. (Renseignement donné par M. le Dr de Larroque, à Lamagistère, Tarn-et-Garonne.)

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — FÉVRIER 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	»	2	»	3	6	»	3	4
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	2	»	»	3		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	2	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation.	1	»	»	4	»	»	2	»	»
Morsures aux mains — simples	»	9	16	»	30	56	»	2	6
Morsures aux mains — multiples	»	7		»	26		»	4	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	10	»	»	29	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation.	6	»	»	26	»	»	5	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	3	11	»	4	18	»	1	9
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	8		»	14		»	8	
Cautérisations efficaces	1	»	»	1	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	9	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation.	2	»	»	8	»	»	6	»	»
Habits déchirés.	8	»	»	15	»	»	7	»	»
Morsures à nu.	3	»	»	3	»	»	2	»	»
Morsures multiples en divers points du corps.	»	»	»	»	5	5		1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation.	»	»	»	4	»	»	1	»	»
Habits déchirés.	»	»	»	4	»	»	»	»	»
Morsures à nu	»	»	»	5	»	»	1	»	»
Totaux. — **Français et Algériens**		28	29		70	85		11	20
Totaux. — **Etrangers.**		1			15			9	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					134				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 121 fois; chats, 11 fois; cheval, 1 fois; chacal 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. AVRIL 1891. N° 4

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES OSTÉOMYÉLITES A STAPHYLOCOQUES ET A STREPTOCOQUES

PAR MM. LANNELONGUE ET ACHARD.

(Avec les planches III, IV, V, VI.)

(Travail du laboratoire d'histologie du Collège de France.)

Lorsque les mémorables travaux de M. Pasteur eurent posé les bases d'une science nouvelle, la microbie, l'une de ses premières applications à la pathologie eut pour objet l'étude des phénomènes de la suppuration. La thérapeutique en recueillit les premiers fruits, et l'on sait quel merveilleux succès couronna, dès le début, l'emploi de la méthode antiseptique. A son tour, la pathogénie ne tarda pas à bénéficier aussi largement de la nouvelle doctrine. Dès l'année 1880, M. Pasteur, étudiant le pus d'origines diverses, isola par la culture un microbe que renfermait un foyer d'ostéomyélite provenant du service de l'un de nous. A la suite de ces recherches, les nombreux travaux qui furent faits, de différents côtés, sur l'origine et la nature de l'ostéomyélite, confirmèrent, en le précisant, le rôle pathogène du microbe déterminé par M. Pasteur. Mais, dans ces derniers temps, la question a évolué. Il n'y a plus une ostéomyélite aiguë, mais bien des ostéomyélites aiguës, produites par différents microbes. La même évolution s'est accomplie d'ailleurs dans

l'histoire de la plupart des lésions infectieuses qui frappent un même organe et que la classification anatomique des maladies définissait comme autant d'affections distinctes : elles sont considérées aujourd'hui comme les localisations d'infections variées sur un même organe. C'est à ce point que le présent travail a pour objet d'amener la question de l'ostéomyélite. Il est, à ce titre, la suite naturelle des recherches inaugurées par l'illustre fondateur de la doctrine microbienne.

La maladie, généralement désignée aujourd'hui sous le nom d'ostéomyélite aiguë, a depuis longtemps frappé les cliniciens par ses allures d'affection générale. On en trouve la preuve dans les anciens termes de typhus des membres (Chassaignac), fièvre pseudo-rhumatismale (Roser), périostite maligne. C'est qu'en effet, l'ensemble du tableau morbide qui rappelle parfois le rhumatisme aigu ou la fièvre typhoïde, le caractère de certains accidents, tels que les foyers multiples, les métastases viscérales et toutes les manifestations de la pyohémie, étaient bien propres à faire soupçonner, derrière les lésions localisées au squelette, une influence générale, un de ces états que l'on qualifiait de dyscrasiques et que nous appelons maintenant infectieux. Aussi n'est-il pas étonnant que, dès le début des recherches microbiologiques qui ont de nos jours transformé l'étiologie générale des maladies, l'on ait songé à démontrer l'origine microbienne de cette affection.

Toutefois il convient de présenter les choses sous leur vrai jour en rappelant que les états morbides envisagés par Chassaignac, Roser, etc., ne s'adressaient qu'à un groupe d'ostéomyélites relativement très peu nombreux, aux formes les plus graves qui seules étaient considérées par eux comme des ostéomyélites, ce qui n'était même pas accepté par la plupart des auteurs. L'un de nous [1] a élargi considérablement le cadre de cette affection en montrant, dès l'année 1878, que l'ostéomyélite des jeunes enfants et des adolescents comprenait une longue série de types cliniques, rangés à tort parmi les affections superficielles des os, c'est-à-dire parmi les périostites, ou rattachés inexactement aux ostéites épiphysaires, bien qu'ils apparussent fréquem-

1. Lannelongue, De l'ostéomyélite aiguë pendant la croissance. Paris, 1879 (Mémoire présenté à l'Académie de médecine le 28 mars 1878).

ment sur des os dépourvus d'épiphyses. Ces idées avec les conséquences qu'elles entraînaient et qui ont eu pour résultat de modifier le traitement de ces maladies, ont été généralement acceptées depuis.

Les premières recherches microbiologiques furent consacrées seulement à constater au microscope la présence de bactéries dans les tissus lésés. Klebs[1], en 1873, y décrivit un *microsporon septicum ;* Recklinghausen[2], dans un cas de Lücke, observa des microcoques dans les foyers osseux et viscéraux ; Eberth[3] en vit également dans le sang et le périoste. Neureutter et Salomon signalèrent l'existence de vibrions dans les tissus malades. Max Schüller[5] décrivit et figura des microbes dans une articulation dont il avait fait l'examen histologique et qui confinait à un foyer d'ostéomyélite infectieuse. En France, M. Nepveu[6] avait aussi observé des microbes dans le pus d'ostéomyélites provenant du service de M. Verneuil.

Bientôt on ne se borna pas seulement à constater *in situ* la présence de microorganismes dans les tissus malades : on chercha à les isoler par la culture. Dès 1880, comme nous le rappelions tout à l'heure, M. Pasteur[7] obtint avec le pus d'une ostéomyélite, des cultures d'un microbe troublant rapidement le bouillon et tout à fait semblable à celui qu'il venait de découvrir dans le furoncle. Quelque temps après, les procédés de culture sur milieux solides vinrent faciliter l'étude de ces microorganismes ; ils sont aujourd'hui bien connus : ce sont les staphylocoques pyogènes et notamment le *staphylococcus pyogenes aureus*. Grâce à la méthode des cultures, la présence de ces microbes a pu

1. Klebs, *Arch. f. experim. Pathol. und Pharmacol.*, 1873, Bd. I, p. 31 ; — et : *Beiträge zur pathol. Anat. der Schusswunden*, p. 120.

2. Luecke, Die primäre infectiöse Knochenmark und Knochenhautentzündung : *Deutsche Zeitschr. f. Chir.*, 1874, Bd. IV, p. 218.

3. Eberth, Zur Kenntniss der Mycosen : *Virchow's Archiv f. pathol. Anat. und Physiol.*, 1875, Bd. LXV, p. 341.

4. Th. Neureutter et Salomon, *Oesterr. Jahrb. f. Päd.*, 1876, Bd. VII, p. 23.

5. Max Schuller, Zur Kenntniss der Mikrokokken bei acuter infectiöser Osteomyelitis ; Mikrokokkenherde im Gelenkknorpel : *Centralbl. f. Chir.*, 1881, n° 42.

6. G. Thellier, De l'ostéomyélite spontanée considérée dans son étiologie et sa pathogénie : thèse de Paris, 1883.

7. L. Pasteur, De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes : *Bull. de l'Acad. de médecine*, 4 mai 1880, p. 435.

être établie dans nombre de cas d'ostéomyélite, par Rosenbach [1], Socin et Garré [2], etc.

Enfin les recherches expérimentales vinrent à leur tour compléter la démonstration du rôle pathogène qui appartient aux staphylocoques dans la production de l'ostéomyélite aiguë. Déjà Rosenbach [3], Kœstlin [4], en inoculant du pus dans les veines et en produisant un traumatisme des os, avaient obtenu la suppuration osseuse. Par un procédé analogue, c'est-à-dire en fracturant des os, mais en injectant dans les veines des animaux des cultures pures du staphylocoque orangé, au lieu de pus, plusieurs expérimentateurs, Becker [5], Rosenbach [6], Gangolphe [7], observèrent au niveau des foyers de fracture les lésions de l'ostéomyélite suppurative. F. Krause [8] obtint même dans un cas, sans traumatisme, un abcès de la moelle osseuse au niveau du col fémoral. Mais c'est surtout M. Rodet qui se rapprocha le plus des conditions réalisées dans la pathologie humaine, en produisant les lésions de l'ostéomyélite par l'injection intra-veineuse des staphylocoques pyogènes, sans traumatisme osseux, chez des animaux en voie de croissance [9]. Ces recherches ont été reprises récemment par M. Colzi [10] qui a consacré à l'étude des lésions ainsi obtenues un important travail; au cours de ses nombreuses expériences, cet auteur a reproduit, non seulement dans ses traits généraux, mais encore dans tous ses détails, la maladie telle qu'elle se présente chez l'homme.

Mais dans ces derniers temps, la question de l'ostéomyélite

1. J. Rosenbach, Mikroorganismen bei dem Wundinfectionskrankheiten des Menschen, Wiesbaden, 1884.

2. Socin, Pathogénie de la suppuration : *Congrès français de chirurgie*, 7 avril 1885, p. 103.

3. J. Rosenbach, Beiträge zur Kenntniss der Osteomyelitis : *Deutsche Zeitschr. f. Chir.*, 1878, Bd. X, p. 369.

4. Kœstlin, Experimentelles über die akute infectiöses Osteomyelitis : Inaug-Dissert., Halle, 1880. (*Centralbl f. Chir.*, 1880, p. 322.)

5. *Deutsche medicin. Wochenschrift*, 1888, p. 665.

6. Mikroorganismen, etc.

7 M. Gangolphe. Soc. des sciences médic. de Lyon, octobre 1884 : *Lyon médical*, 2 novembre 1884, p. 283.

8. F. Krause, Ueber einen bei der acuten infectiösen Osteomyelitis des Menschen vorkommenden Mikrokokkus : *Fortschritte der Medicin*, 1884, Bd II, p. 221 et 261.

9. A.-J. Rodet, De la nature de l'ostéomyélite infectieuse : *Revue de chirurgie*, 1885, p. 273 et 636. — M. Jaboulay, Le microbe de l'ostéomyélite aiguë : Thèse de Lyon, 1885.

10. Fr. Colzi, Sulla etiologia della osteomielite acuta : *Lo Sperimentale*, novembre, décembre 1889.

aiguë infectieuse s'est élargie. On a reconnu que les staphylocoques pyogènes ne sont pas seuls à posséder le pouvoir de produire cette lésion. On sait que les streptocoques peuvent aussi lui donner naissance, et nous avons nous-mêmes apporté des matériaux à l'étude clinique et expérimentale de cette nouvelle variété [1]. De plus, d'autres microbes pyogènes ont encore été rencontrés dans des foyers d'ostéomyélite aiguë. Nous avons pour notre part observé deux exemples de pareilles lésions dues au pneumocoque [2]. Divers auteurs ont fait des constatations analogues pour le bacille typhique. Il est vrai que, jusqu'à ce jour, la reproduction expérimentale des altérations osseuses n'a pu être faite avec ces deux derniers organismes, dans les mêmes conditions qu'avec les précédents; toutefois leurs propriétés pyogènes sont assez bien établies pour qu'on ne puisse guère leur refuser le pouvoir de produire également l'ostéomyélite dans l'espèce humaine. En présence de cette pluralité des espèces microbiennes capables d'engendrer le processus de l'ostéomyélite aiguë, la comparaison s'impose entre les lésions qui reviennent à chacune d'elles. Aussi croyons-nous devoir exposer les recherches que nous avons poursuivies avec les streptocoques, et, pour rendre le rapprochement plus facile, nous ferons précéder cette étude d'une description sommaire des lésions expérimentales que nous avons produites avec les staphylocoques. Sur ce premier point d'ailleurs la tâche nous sera aisée, nos résultats ne faisant que s'ajouter à ceux des nombreux auteurs qui ont expérimenté ces microbes.

Lésions produites par les staphylocoques pyogènes

A. *Staphylococcus pyogenes aureus.*

Nos expériences ont porté sur des lapins en voie de croissance. Elles ont consisté dans l'injection de bouillon de culture dans

1. Lannelongue et Achard, Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë, dite infectieuse : *C. R. de l'Acad. des sciences*, 10 mars 1890; *Bulletin médical*, 12 mars 1890, p. 239; — et : Des ostéomyélites à streptocoques : *C. R. de la Société de biologie*, 24 mai 1890, p. 298; *Bulletin médical*, 28 mai 1890, p. 492.

2. Lannelongue et Achard, Un cas d'ostéomyélite à pneumocoques : *Bulletin médical*, 24 août 1890, p. 789. — Depuis la publication de ce premier fait nous en avons observé un second dans des conditions tout à fait semblables.

les veines de l'oreille. Quelques gouttes suffisaient en général pour produire des désordres très marqués et le plus souvent mortels. D'ailleurs nous avons fait varier les conditions relatives à l'âge et au poids des animaux, à l'ancienneté des cultures, aux doses injectées.

Ce qui importe surtout pour l'étude des lésions, c'est la durée de la survie. Dans les premières heures qui suivent l'injection, l'on ne trouve à l'œil nu aucune altération. C'est ce qui eut lieu chez trois lapins : l'un d'eux avait survécu seulement quelques heures à l'inoculation, un autre 19 heures, le dernier 28 heures. Dans un cas, déjà après 20 heures, il existait dans les reins des infarctus rouges et, sur un condyle fémoral, une petite ecchymose. Après 36 heures, nous avons pu constater la formation de foyers purulents : il y avait dans les reins des infarctus avec de petits abcès et, dans les membres, quelques petits abcès sous-périostiques et intra-osseux. Au bout de 42, 43, 48 heures, les lésions des os et des viscères devenaient plus nettes et, au delà de ce temps, nous avons obtenu des lésions généralisées, avec toute la série des altérations du squelette qui caractérisent l'ostéomyélite aiguë.

Mais dans quelques cas, bien que la mort ne fût pas survenue d'une façon rapide, les lésions osseuses ont été des plus minimes ou même tout à fait nulles. Chez un jeune lapin, mort 12 jours après l'injection, on ne constatait dans la moelle osseuse qu'un aspect pointillé, dû à de petites taches blanchâtres, tranchant sur le fond rouge ; mais il y avait des abcès dans le foie et surtout dans les reins. Un lapin adulte, infecté par de petites doses répétées de bouillon virulent, ne présentait aucune lésion des os ; mais il avait une endocardite et de nombreux abcès rénaux. Enfin chez un jeune lapin, ayant résisté à une inoculation et sacrifié un mois après pour une autre expérience, nous avons trouvé, comme trace de l'injection, des cicatrices rénales, blanchâtres, déprimées, seul vestige de petits infarctus.

Ces faits montrent que les lésions rénales peuvent exister à l'exclusion de toute autre, qu'elles sont les plus constantes dans l'infection que produisent les staphylocoques par la voie sanguine, enfin qu'elles sont en général précoces dans leur apparition. On les trouve d'ailleurs signalées avec fréquence par les divers expérimentateurs. Colzi les mentionne souvent dans ses

nombreuses expériences; Krause et surtout Ribbert [1] avaient insisté déjà sur leur importance.

Les abcès rénaux se présentent souvent comme de petites taches, de couleur blanc jaunâtre, à la surface de l'organe. Sur la coupe, ce sont de petits foyers miliaires, siégeant soit dans la substance corticale, soit dans la substance médullaire. Mais ils peuvent aussi acquérir un grand volume et donner lieu à de grosses bosselures qui déforment la surface des reins. Quelquefois on trouve de petits abcès conglomérés, formant une sorte de bouquet de petits grains purulents. Dans un cas, il s'était développé, consécutivement à des abcès superficiels, une périnéphrite suppurée, sous la forme d'un exsudat fibrino-purulent qui infiltrait le capsule d'enveloppe.

Avant la formation du pus, on observe dans les reins des infarctus qui se présentent à la surface comme de simples taches d'un rouge sombre. Sur une coupe longitudinale, on reconnaît qu'ils offrent la disposition classique en pyramides. A un stade plus avancé, leur partie centrale prend une couleur pâle, grisâtre, tandis que le bord, légèrement sinueux, garde une couleur rouge. Enfin de petits foyers de suppuration se développent dans le territoire de l'infarctus et ils donnent lieu, par leur confluence, à des abcès plus volumineux. Outre les abcès plus ou moins arrondis, on voit fréquemment sur les coupes longitudinales des reins, des stries ou traînées purulentes qui suivent la direction rayonnée des tubes droits et convergent vers la papille.

L'examen histologique, au niveau des foyers rénaux, montre des microbes, en amas parfois considérables, dans les vaisseaux de la zone médullaire. Ce sont des amas semblables, disposés en traînées longitudinales, qui donnent lieu aux stries purulentes que nous venons de mentionner. Dans toute la zone mortifiée, il existe en général des microbes disséminés, mais peu nombreux, ne formant que de petits amas dans l'intervalle des tubes, plus rarement dans la cavité même des tubes, dont les cellules sont tuméfiées, en partie desquamées, granuleuses, et presque insensibles aux réatifs colorants. L'envahissement des tubes par les microbes a pour conséquence le passage des parasites dans

1. Ribbert, Die Schicksale der Osteomyelitis-Coccen im Organismus : *Deutsche medicin. Wochensch.*, 16 octobre 1884, p. 682.

l'urine, maintes fois signalé par les auteurs, et que nous avons pu constater à notre tour.

L'infarctus est limité par une zone dans laquelle les interstices des tubes sont bourrés de leucocytes. Enfin, autour de cette zone d'infiltration leucocytique, le tissu rénal présente une vive congestion.

On peut voir dans le territoire de l'infarctus des hémorragies interstitielles et des abcès plus ou moins volumineux, contenant de nombreux microbes. Toutefois, lorsque les lésions sont déjà un peu anciennes, il est fréquent de trouver des foyers assez considérables, remplis de cellules embryonnaires, et dans lesquels les microbes ne se rencontrent qu'en très petite quantité. Il arrive aussi, dans les grands infarctus, que les tubes se dépouillent complètement de leur épithélium, de sorte qu'on ne trouve plus, dans la zone médullaire, que la charpente conjonctive épaissie, formant seule la paroi des tubes dont la lumière est incomplètement remplie par des amas granuleux ou hyalins. Les artères présentent parfois des lésions d'endartérite végétante.

Les autres organes sont atteints de lésions offrant le même type d'infarctus suppuré, mais dans des proportions bien diverses.

Les poumons sont rarement le siège d'abcès métastatiques.

Le cœur est au contraire fréquemment atteint. Ses lésions consistent en de petits points miliaires, d'un blanc jaunâtre, situés à la surface externe, plus rarement à la surface interne ou même en plein myocarde. Dans un cas nous avons vu un abcès acquérir le volume d'une lentille. A l'examen histologique on observe un foyer de nécrose, entouré d'une couronne d'infiltration leucocytique. Les faisceaux musculaires nécrosés ne se colorent pas par les réactifs, et au centre du foyer se trouve un amas de microbes en forme de zooglée. On rencontre aussi de petits amas de microbes disséminés dans le myocarde.

La rate est ordinairement indemne d'abcès.

Le foie présente, dans quelques cas, des foyers de suppuration qui pourraient en imposer à l'œil nu pour les productions parasitaires qu'on y rencontre avec tant de fréquence chez le lapin. Aussi l'examen histologique et les cultures peuvent-ils être nécessaires pour établir leur nature. Nous n'avons point observé que les lésions produites par les coccidies, qui abondaient chez

certains de nos animaux, fussent un point d'appel pour le développement des abcès.

Un détail qui mérite d'être relevé, c'est qu'on ne trouve pas de dégénérescence graisseuse dans le foie ni dans les reins, qu'il s'agisse d'infection rapidement mortelle, ou bien d'infection à marche plus lente, entraînant la mort après des suppurations multiples. Nous avons pu vérifier ce fait sur des fragments d'organes traités par l'acide osmique. C'est seulement au niveau des infarctus rénaux que nous avons trouvé des traces de matières grasses. Mais dans le reste du rein, l'épithélium était absolument indemne de granulations graisseuses, et dans le foie on trouvait seulement, disséminées dans certaines cellules, quelques granulations extrêmement fines que l'acide osmique avait colorées en noir. Au contraire, dans l'espèce humaine, il est habituel de rencontrer, chez les sujets ayant succombé aux accidents de l'ostéomyélite, une dégénérescence graisseuse souvent très prononcée dans ces organes.

Les localisations morbides sur le squelette se montrent sous trois formes : abcès sous-périostiques, abcès et infiltrations intra-médullaires, suppurations articulaires.

Les abcès sous-périostiques ont certains sièges de prédilection. La surface du tibia en porte fréquemment, soit sur le corps de l'os, soit vers l'extrémité inférieure de la diaphyse. Sur l'humérus, ils se trouvent souvent en divers points de l'extrémité supérieure. Le fémur en présente plus rarement, soit au niveau des condyles, soit vers le col. Leur volume est variable. A la surface du tibia (pl. III, fig. 6 et 9) ils sont fréquemment multiples et de dimensions miliaires. Parfois ils sont accompagnés de petits points ecchymotiques qui semblent représenter le premier stade du processus ; ces deux lésions peuvent, en effet, se superposer et l'on voit alors un petit abcès entouré d'une étroite collerette hémorragique, comme si la suppuration s'était développée au centre de la tache ecchymotique.

Ces abcès sous-périostiques forment de petites élevures jaunâtres, ressemblant à des grains et contenant une goutte de pus épais qu'on peut faire sortir par piqûre ou tout au moins détacher avec la pointe d'un scalpel. Lorsqu'on a ainsi enlevé ce pus, il reste soit une surface rugueuse, soit une petite dépression cupuliforme creusée dans l'os ; celle-ci peut conduire jusque dans le

canal médullaire et il n'est pas rare de constater la communication d'un foyer sous-périostique avec un foyer profond.

Lorsqu'ils ont une certaine étendue, les abcès sous-périostiques peuvent donner lieu à la formation d'un séquestre superficiel (pl. III, fig. 11).

Dans les cas un peu anciens, on constate, au pourtour de la dépression correspondant à l'abcès, un épaississement du tissu osseux formant un rebord légèrement saillant et qui représente l'indice d'un processus réparateur.

Les abcès intra-médullaires, visibles seulement après qu'on a fendu les os avec un couteau, s'observent de préférence, mais non exclusivement, il s'en faut, dans les régions juxta-épiphysaires de la diaphyse des os longs, surtout à la partie inférieure du fémur et à la partie supérieure de l'humérus (pl. III, fig. 3).

Dans les cas anciens, ils forment de petits foyers bien circonscrits et comme encapsulés. Mais le plus souvent ils consistent seulement en une goutte de pus crémeux, située en pleine moelle et tranchant nettement par sa couleur jaunâtre sur le fond rouge lie de vin du tissu médullaire. D'autres fois, le pus n'est pas collecté et l'on trouve une infiltration diffuse de la moelle dans une étendue plus ou moins grande de la surface de section. Cette infiltration purulente offre un aspect pointillé, blanc jaunâtre marbré de rouge.

Tantôt la suppuration siège dans la moelle qui remplit la cavité du canal médullaire, vers une extrémité de ce canal, tantôt elle se développe dans la zone de tissu spongieux qui termine la diaphyse et qui confine au cartilage de conjugaison. On voit alors les trabécules de ce tissu spongieux prendre une couleur jaunâtre, devenir plus friables et s'infiltrer de pus. Quelquefois même il se forme un petit séquestre isolé, baignant dans le foyer purulent. Enfin la suppuration peut s'étendre jusqu'au contact immédiat du cartilage de conjugaison, former en ce point une véritable nappe purulente et amener ainsi le décollement épiphysaire (pl. III, fig. 10). Cet accident peut aussi résulter du développement d'un abcès sous-périostique, formé à l'union de la diaphyse et de l'épiphyse et qui, en s'étendant progressivement, s'enfonce comme un coin, le long du cartilage, dans la profondeur de l'os.

La suppuration de la moelle osseuse ne s'observe pas exclu-

sivement dans la diaphyse des os longs. On peut encore la constater dans les épiphyses, mais d'une façon beaucoup plus rare, et en cela la pathologie expérimentale se trouve parfaitement d'accord avec la pathologie humaine. Il n'est pas exceptionnel qu'un foyer, né dans la portion juxta-épiphysaire de la diaphyse, arrive à détruire le cartilage de conjugaison et envahisse l'épiphyse. Mais on peut aussi rencontrer des foyers de suppuration développés primitivement dans l'épiphyse elle-même.

Ajoutons que, dans la plupart des os, alors même qu'il ne s'y trouve point de lésions suppuratives, la moelle présente une congestion vive et une couleur lie de vin. Cette congestion veineuse existe souvent encore, d'une façon générale, dans presque tous les membres.

Au niveau des lésions osseuses, l'examen histologique fait voir de nombreux microbes, tantôt agglomérés en amas compacts, tantôt disséminés par petits groupes ou répandus comme une fine poussière dans le tissu médullaire, et parfois à une grande distance des foyers principaux. Les amas microbiens s'observent, soit dans le canal médullaire, soit dans les aréoles du tissu spongieux. On les trouve encore dans la substance compacte, au voisinage des abcès intra-osseux et sous-périostiques ; ils s'y rencontrent parfois en telle abondance qu'ils oblitèrent complètement les canaux de Havers. Enfin les petits abcès miliaires que présente le périoste renferment une accumulation de microbes à la partie profonde de la membrane, et les portions voisines du tissu compact en contiennent aussi une grande quantité (pl. III, fig. 1, et pl. IV, fig. 1 et 2). La disposition des foyers microbiens dans la moelle osseuse rappelle exactement ce que l'on peut voir sur les fragments extraits chez les malades par la trépanation.

Les arthrites purulentes ne sont pas rares dans l'infection par le *staphylococcus aureus*. Souvent elles sont liées à l'existence de lésions des os voisins et représentent en quelque sorte l'abcès sous-périostique d'un foyer siégeant à l'extrémité articulaire de l'os. Mais, dans certains cas, elles en sont tout à fait indépendantes ; ce sont de véritables localisations métastatiques, comparables aux épanchements purulents des grandes séreuses (plèvre, péricarde), qui s'observent exceptionnellement dans l'infection expérimentale chez le lapin, mais qui sont loin d'être

aussi rares dans la pathologie humaine. Ces arthrites frappent non seulement les grandes jointures (épaule, coude, genou, hanche), mais aussi les petites articulations du carpe et du tarse. Plusieurs fois, sans qu'il y eût d'arthrite véritable, nous avons trouvé sur la synoviale articulaire une vive injection et même des taches ecchymotiques.

Ajoutons, pour compléter la série des lésions qui siègent dans les membres, qu'on observe de la suppuration des synoviales tendineuses, et des abcès, parfois très volumineux, dans le tissu conjonctif inter-musculaire. Les muscles peuvent être atteints à des degrés très divers. Quelquefois ils présentent simplement de petites taches congestives, comme des têtes d'épingle, et de petits abcès punctiformes, de couleur jaunâtre. Mais les abcès y peuvent atteindre de grandes dimensions, les muscles peuvent être envahis par des abcès venus des parties voisines ; ils sont alors décollés par la suppuration ; souvent aussi, ils sont seulement infiltrés de pus dans toute leur masse et présentent un aspect jaunâtre, lardacé. On reconnaît au microscope que cette infiltration correspond à des amas de microbes, formant des traînées dans les interstices des fibres, et à une abondante migration de globules blancs. Quant aux faisceaux primitifs, ils peuvent persister avec leurs caractères normaux au milieu des microbes et des leucocytes ; mais d'autres fois il sont gonflés, régulièrement cylindriques, homogènes et vivement colorables par le carmin ; souvent encore on y observe la multiplication des noyaux. Quant aux microbes, ils ne sont pas toujours abondants aux points où les éléments embryonnaires sont le plus nombreux, et même ils peuvent faire entièrement défaut dans des portions de muscles qui sont complètement infiltrées de leucocytes. C'est là d'ailleurs une remarque générale qui s'applique aux lésions de tous les organes : les tissus qui présentent au plus haut degré la migration des leucocytes et la prolifération cellulaire ne sont pas ceux qui renferment le plus de microbes.

B. *Staphylococcus pyogenes albus.*

Le *staphylococcus pyogenes albus* a été souvent rencontré, associé avec le *staphylococcus aureus*, dans le pus d'ostéomyélites.

Rosenbach, Garré, Fowler[1], Kraske, Colzi, Pertik[2], mentionnent cette coïncidence ; nous en avons nous-mêmes observé un exemple. Mais ce microbe peut aussi exister seul dans les foyers osseux, comme le montre une des observations de Rosenbach. Nous l'avons trouvé à l'état pur dans six ostéomyélites aiguës, contre vingt-deux cas dans lesquels le *staphylococcus aureus* était seul en cause. Il ne semble pas d'ailleurs qu'il y ait de différences cliniques entre les faits qui relèvent exclusivement de l'un ou l'autre de ces microbes.

L'étude expérimentale du staphylocoque blanc a été faite par MM. Rodet et Jaboulay. On trouve dans la thèse de ce dernier auteur l'exposé de quelques recherches montrant que ce microbe peut engendrer des lésions osseuses tout à fait semblables à celles qu'on obtient avec le staphylocoque orangé. Colzi a produit aussi, par l'injection sanguine de ce microbe, des foyers de suppuration osseuse. Mais tandis que MM. Rodet et Jaboulay ne trouvent pas de différence notable, au point de vue de la virulence, entre les staphylocoques blanc et orangé, Colzi insiste sur la moindre intensité de l'action pathogène exercée par le *staphylococcus albus*. Ainsi, dans quatre expériences, il n'a obtenu que des résultats négatifs en injectant 4 ^{co} de liquide virulent, alors qu'il provoquait des lésions au moyen de 1/2 ou 1/6 de c. c. seulement du liquide préparé de la même manière avec le *staphylococcus aureus*. Les inoculations sous-cutanées ont aussi témoigné, entre ses mains, de la moindre virulence du staphylocoque blanc. Les résultats de nos propres recherches sont conformes à cette dernière opinion. Il nous a fallu des doses plus fortes de ce microbe pour produire les mêmes lésions qu'avec le staphylocoque orangé, et nous avons dû plusieurs fois recourir à des inoculations répétées. Aussi pensons-nous qu'on peut établir entre les deux espèces de staphylocoques une distinction fondée à la fois sur la virulence et le pouvoir chromogène.

C'est contre cette manière de voir que se sont élevés MM. Rodet et Courmont, pour qui les deux staphylocoques ne

1. G. K. Fowler, A case of diffuse osteo-myelitis with remarks upon the parasitic origin of the disease : *New York medical journal*, 1886, p. 7.

2. O. Pertik, Osteomyelitis infectiosa : *Pester medicinisch-chirurgische Presse*, 1890, Bd. XXVI, p. 1, 28, 75 et 191.

font qu'une seule et même espèce. A l'appui de leur opinion, ces auteurs citent les variations du pouvoir chromogène observées par eux sur certains échantillons de ces microbes qui, dans la série des cultures successives, passaient de la couleur orangée à la couleur blanche[1]. Nous n'avons point vu de pareilles transformations. Diverses circonstances, les variations de température, la privation d'air, l'insolation, les changements dans la composition chimique du milieu nutritif, la vieillesse des cultures, nous ont permis d'obtenir des modifications passagères dans le développement et la couleur du *staphylococcus aureus*. Mais nous n'avons jamais aboli d'une façon durable son pouvoir chromogène, qui reparaissait au contraire avec toute sa force lorsque ce microbe était replacé sur la gélose ordinaire et dans les circonstances favorables à son développement[2]. Les échantillons de staphylocoques qui nous ont servi dans nos expériences ont même fait preuve d'une très grande fixité, car après plus de cinquante générations, le *staphylococcus aureus*, cultivé depuis vingt-deux mois, et le *staphylococcus albus* depuis un an, ont gardé intacte leur coloration respective. Dans ces conditions, la question de l'unité d'espèce n'a qu'un intérêt théorique. Nous n'avons pas à soulever ici une discussion sur la définition des termes espèce et variété, ni sur le transformisme des microbes. Il nous suffit de constater que les staphylocoques blanc et orangé peuvent chacun posséder, sous le rapport de la couleur, une stabilité très grande et se distinguer l'un de l'autre, non seulement par le pouvoir chromogène, mais aussi par la virulence.

Nous devons ajouter que le *staphylococcus albus* avec lequel nous avons poursuivi nos recherches a fait voir d'assez grandes variations de son pouvoir pathogène, surtout dans le cours des premières générations, tandis que le *staphylococcus aureus* était

1. A. Rodet et J. Courmont, Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë juxta-épiphysaire : *C. R. de la Société de biologie*, 19 avril 1890, p. 186. — J. Courmont, Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë infectieuse : *ibid.*, 26 juillet 1890, p. 480.

2. Lannelongue et Achard, Sur la distinction des staphylocoques blanc et orangé d'après la virulence et le pouvoir chromogène : *C. R. de la Société de biologie*, 7 juin 1890, p. 348 ; *Bulletin médical*, 11 juin 1890, p. 539. — Comme nous, Besser a observé la décoloration du staphylocoque orangé sous diverses influences et, comme nous, il a constaté que ce microbe recouvrait son pouvoir chromogène dès qu'il était replacé dans des conditions favorables. — L. V. Besser, Mikroby gnoienia (les microbes de la suppuration) : *Vratch*, 1888, p. 337, 381, 387.

bien plus constant dans ses effets. Rosenbach avait déjà noté que le développement de ce microbe n'est pas toujours régulier, et qu'il donne parfois des cultures pauvres, mais qui fournissent après un nouvel ensemencement des cultures luxuriantes.

Enfin l'atténuation qui se produit à la longue, après une série d'ensemencements successifs, pour le *staphylococcus aureus*, ne paraît pas se faire d'une façon proportionnelle pour le *staphylococcus albus*. Ainsi, dans nos premières expériences avec le staphylocoque blanc, il fallait, comme nous l'avons déjà dit, des doses beaucoup plus fortes pour produire les mêmes lésions qu'avec le staphylocoque orangé. Mais plus tard, dans les expériences comparatives que nous avons faites avec d'anciens échantillons des deux staphylocoques, la différence était bien moins accentuée. Ainsi deux lapins de la même portée furent inoculés avec une dose égale des deux staphylocoques, soumis depuis 18 générations à des conditions identiques de culture et de réensemencement ; l'échantillon de *staphylococcus aureus* était de 50e génération, celui de *staphylococcus albus* de 43e génération. Le lapin qui reçut le premier pesait 1,150 grammes : il mourut une trentaine d'heures après l'injection. Celui qui reçut le second pesait 1,440 grammes et survécut plus de 50 heures. Dans une autre expérience, deux lapins de la même portée reçurent dans les veines un centimètre cube de bouillon virulent provenant des mêmes échantillons de staphylocoques, l'orangé à la 56e, le blanc à la 49e génération. L'animal qui fut inoculé avec le premier pesait 1,535 grammes et mourut le 14e jour : il avait de nombreux abcès rénaux, un foyer de suppuration dans la partie inférieure de tibia, accompagné d'arthrite tibio-tarsienne, et de plus un foyer dans la partie supérieure de l'humérus, avec arthrite scapulo-humérale. Quant au lapin inoculé avec le staphylocoque blanc, il pesait 1,550 grammes et mourut au bout de 16 jours : il présentait des lésions rénales bien moins prononcées, un foyer purulent dans la partie inférieure du tibia, avec arthrite tibio-tarsienne, et un abcès sous-périostique en voie de guérison, avec hyperostose de réparation, sur le corps d'un fémur. En somme, on voit que l'inégalité de virulence entre les deux microbes, pour être encore appréciable, était devenue assez légère.

Aussi avons-nous voulu nous assurer de nouveau que cette

différence était plus considérable avec des échantillons moins anciens. Pour cela, nous avons pris deux tubes de gélose ensemencés le même jour, l'un avec le pus d'un abcès qui contenait le *staphylococcus aureus*, l'autre avec le pus d'une ostomyélite qui renfermait le *staphylococcus albus* à l'état de pureté. Ces deux tubes nous ont servi à ensemencer des bouillons; puis avec ces cultures de deuxième génération, faites dans des conditions identiques, nous avons inoculé simultanément deux lapins adultes, à la dose de 0,75^{cc} de bouillon virulent. L'animal qui reçut le staphylocoque orangé était particulièrement vigoureux et pesait 2,630 grammes : il mourut en 19 heures sans présenter aucune lésion appréciable, si ce n'est quelques taches congestives dans les reins. Celui qui reçut la même dose de staphylocoque blanc pesait 2,550 grammes; il survécut 16 jours, pendant lesquels de nombreuses lésions se développèrent : l'autopsie permit, en effet, de constater des abcès dans les reins et le cœur, des foyers multiples de suppuration dans les os, les articulations et le tissu cellulaire des membres. Le premier avait donc succombé à la forme suraiguë et pour ainsi dire foudroyante de l'infection; le second, à la forme pyohémique que produit aussi, mais à dose moins forte, le *staphylococcus aureus*.

Les lésions produites par le staphylocoque blanc sont identiques à celles que détermine le staphylocoque orangé. Nous retrouvons ici, parmi les lésions des viscères, les altérations fréquentes et précoces des reins. Les abcès rénaux peuvent être très nombreux (pl. V, fig. 4); leur disposition est tout à fait semblable à celle des abcès produits par le *staphylococcus aureus*. Ils peuvent exister aussi à titre de lésion à peu près isolée : plusieurs fois nous les avons trouvés à l'exclusion de toute altération osseuse. Dans un cas même, malgré le jeune âge de l'animal qui ne pesait que 420 grammes, le squelette ne présentait, au bout de six jours, aucune particularité, si ce n'est un aspect rouge et légèrement rugueux sur la face postérieure d'un fémur, au-dessus des condyles, tandis que l'un des reins offrait un foyer de suppuration. Enfin, chez un lapin sacrifié un mois après l'inoculation, nous avons trouvé, à la surface des reins, des cicatrices absolument semblables à celles que nous avons signalées plus haut dans l'infection par le staphylocoque orangé.

Le cœur, le foie peuvent être atteints, comme il arrive avec le microbe précédent. Nous avons trouvé une fois une péricardite séro-fibrineuse. Un lapin présentait un foyer de bronchopneumonie suppurée.

Quant aux lésions du squelette, elles se montrent à leur tour avec tous les caractères décrits à propos du *staphylococcus aeruus*. Nous retrouvons les abcès sous-périostiques (pl. V, fig. 7 et 8) et intra-osseux (fig. 5 et 6), avec leur disposition habituelle, leur siège juxta-épiphysaire (fig. 6) et plus rarement épiphysaire (fig. 5). Le rapport qui unit les foyers profonds aux abcès superficiels peut de même être reconnu dans un certain nombre de cas (fig. 1 et 3, A et B.). Les décollements épiphysaires, les séquestres peuvent résulter de ces suppurations osseuses. On observe aussi des arthrites purulentes, indépendantes ou non de lésions osseuses ; nous en avons vu à l'épaule. au coude, au carpe, au cou-de-pied. Il est inutile de répéter à propos de tous ces désordres ce que nous avons dit précédemment. La seule particularité que présentent, d'une manière générale les abcès produits par le *staphylococcus albus*, c'est leur couleur blanche, qui se distingue assez bien de la couleur jaune verdâtre des abcès produits par le *staphylococcus aureus*.

Nous devons donc conclure qu'il n'y a aucune différence essentielle dans la forme des lésions que déterminent les deux staphylocoques, et cette similitude existe non seulement dans les altérations osseuses, mais encore dans les lésions des autres organes.

Lésions produites par le streptocoque pyogène.

La présence de streptocoques dans le pus d'ostéomyélites a été constatée en plusieurs circonstances. Dans un fait rapporté par Golding-Bird[1], l'examen microscopique montra des micrococques en chaînettes et en groupes ; mais l'ensemencement sur pomme de terre ayant produit des cultures orangées, il est manifeste que le streptocoque n'était pas seul en cause. Rosenbach[2].

1. H. Golding-Bird, Micrococci (streptococci) from. abscess in a case of acute infective osteomyelitis : *Trans. of the Pathological Society of London*, march 4th, 1884, vol. XXXV, p. 273.
2. J. Rosenbach, Mikroorganismen, etc , p. 53.

dans un cas compliqué d'érysipèle, a rencontré à la fois le staphylocoque orangé et le coccus en chaînettes, qui lui ont donné chacun des cultures. Kraske [1], dans un fait à propos duquel il insiste sur la gravité plus grande des associations microbiennes, signale les streptocoques unis aux staphylocoques et à des bacilles; il est vrai qu'il n'a point isolé les streptocoques par la culture, mais il les a observés en grand nombre par l'examen microscopique. De ces cas mixtes on ne saurait évidemment conclure que les streptocoques puissent par eux-mêmes déterminer l'ostéomyélite. Auparavant, Rattone avait bien trouvé ces microbes à l'état isolé, dans le pus d'un foyer osseux; toutefois, d'après Colzi qui cite cette observation, il ne serait pas certain qu'il s'agît d'une ostéomyélite aiguë commune.

Grâce à des faits plus récents, l'existence de cette variété d'ostéomyélite, produite exclusivement par le streptocoque pyogène, est aujourd'hui solidement établie. Nous avons rapporté ailleurs les deux premières observations dans lesquelles ce microbe se trouvait à l'état de pureté. Une première fois, il s'agissait d'une ostéomyélite de l'extrémité supérieure du tibia, avec vaste décollement périostique et disjonction épiphysaire, chez une fillette de dix-huit jours qui mourut d'érysipèle. Dans le second fait, c'était une ostéomyélite du sacrum, ayant donné lieu à un séquestre volumineux et à une vaste collection purulente, à la fois intra et extra-pelvienne, chez un garçon de sept semaines qui, dès l'âge de vingt jours, avait eu aux pieds des abcès d'origine osseuse. Un nouveau cas analogue a été présenté récemment par M. Chipault à la Société anatomique [2] : il concernait aussi un nouveau né, âgé de deux mois et demi, qui présentait un abcès du sacrum, ainsi que des arthrites des deux coudes et d'une hanche, avec fusées purulentes dans les membres, suppuration et destruction d'une partie des extrémités osseuses correspondantes. Dans cette dernière observation, la prédominance des arthrites sur les lésions de la moelle des os apparaît d'une façon manifeste. Enfin nous avons fait récemment le

1. P. Kraske, Zur Aetiologie und Pathogenese der acuten Osteomyelitis : *Arch. f. klin. Chirurgie*, 1887, Bd. XXXIV, p. 701.

2. A. Chipault, Ostéomyélite à streptocoques d'origine puerpérale chez un nouveau-né. Ostéoarthrites suppurées multiples : *Bulletins de la Société anatomique*, 6 juin 1890, p. 280.

diagnostic d'une ostéomyélite à streptocoques, siégeant à la partie inférieure du péroné, chez un garçon de neuf ans, et ce diagnostic a été confirmé par l'étude microbiologique du pus. Ce cas présentait des signes assez différents de ceux qui se montrent dans l'ostéomyélite à staphylocoques, et en le rapprochant des exemples analogues on peut tenter dès maintenant une description nosologique de cette variété d'ostéomyélite, tout en faisant remarquer que les faits ne sont, ni assez nombreux, ni assez minutieusement observés, pour qu'on puisse en faire un tableau complet.

Le début de l'ostéomyélite à streptocoques paraît très aigu et se rapproche des formes graves de l'ostéomyélite à staphylocoques. Mais, à moins que l'infection ne se généralise en présentant les caractères de la pyohémie, l'état général ne tarde pas à présenter une détente que justifient d'ailleurs les modifications locales des parties malades; ainsi la fièvre, précédée ou non de frissons, après avoir été intense, tombe en deux ou trois jours, en subissant des oscillations d'un degré du matin au soir. Les douleurs spontanées semblent moins vives que dans l'ostéomyélite à staphylocoques, et cependant on détermine par la pression, sur l'os atteint, une douleur vive dont l'intensité augmente à mesure qu'on se rapproche du foyer du mal. L'examen du gonflement montre aussi des différences nouvelles avec ce qu'on voit dans l'ostéomyélite à staphylocoques. La suppuration y est plus prompte et la fluctuation très nette et très rapidement apparente : il semble que la fonte des éléments anatomiques, qui contribue avec la diapédèse à produire le pus, soit prompte et rapidement complète; de plus, la suppuration prend vite d'assez vastes proportions, elle est diffuse et abondante.

La peau rougit vite et présente les caractères des angioleucites réticulaires ou de l'érysipèle, et il y a un œdème sous-cutané assez étendu. On ne voit pas se dessiner sous la peau le réseau veineux si remarquable de l'ostéomyélite à staphylocoques; nous ne l'avons pas du moins trouvé dans les trois cas qu'il nous a été donné d'observer, et Chipault ne le mentionne pas non plus. Si les faits ultérieurs établissent qu'il en est toujours ainsi, ce sera un signe différentiel important. Dans l'ostéomyélite, la dilatation veineuse sous-cutanée autour du foyer, et plus exactement vers la racine des membres, semble indiquer

que l'infection se propage par les veines ou du moins que les produits microbiens eux-mêmes pénètrent de l'os dans les veines, dont ils amènent la dilatation secondaire. On pourrait toutefois fournir du fait une autre explication, et dire avec le professeur Bouchard et Charrin que les produits solubles agissent, par l'intermédiaire des centres nerveux ou directement, en paralysant les vaisseaux périphériques de manière à favoriser la diapédèse.

Quoi qu'il en soit, la dilatation veineuse est un signe à peu près constant dans l'ostéomyélite à staphylocoques, et l'un de nous a jadis longuement appelé l'attention sur ce caractère. Jusqu'ici il a fait défaut dans les ostéomyélites à streptocoques; mais, en revanche, il semble que dans cette dernière affection les appareils lymphatiques soient le siège d'un envahissement secondaire; l'angioleucite réticulaire en est un premier effet, et il en est un autre qui fait défaut dans l'ostéomyélite à staphylocoques et que nous avons rencontré deux fois dans celle à streptocoques (ostéomyélites du péroné et du tibia), c'est l'adénite des ganglions qui reçoivent les lymphatiques de la région malade. Chez l'un de ces malades (péroné) on trouva au troisième jour de l'affection une adénite crurale, caractérisée par un ganglion du volume d'un haricot, très sensible.

Enfin les complications articulaires dans les jointures éloignées sont plus communes dans l'ostéomyélite à streptocoques, et ce fait est en parfait accord avec les résultats que nous avons obtenus expérimentalement chez nos animaux.

Si nous voulions retracer en quelques traits la physionomie clinique de l'affection, nous dirions : Évolution locale des accidents plus prompte et surtout suppuration assez rapidement collectée en vastes foyers; fluctuation très manifeste; pus liquide et plutôt séreux, moins poisseux et moins verdâtre que celui de l'ostéomyélite à staphylocoques, collecté sans empâtement périphérique montueux; rougeur diffuse et plus érysipélateuse des téguments avec adénite dans le groupe des ganglions voisins, absence de réseaux veineux sous-cutanés, tels sont en peu de mots les caractères locaux propres à l'ostéomyélite à streptocoques. Il convient d'y joindre une invasion très brusque des accidents avec réaction générale intense au début, température de 39° à 40°, mais tombant assez vite dès que le pus est collecté, en offrant préalablement des oscillations assez grandes du matin au soir,

qui reparaîtront très marquées si l'affection se complique de pyohémie proprement dite.

Ajoutons enfin que, dans chacun des trois premiers cas, il s'agissait de nouveau-nés dont les mères avaient éprouvé des accidents puerpéraux. Il semble donc, puisque le streptocoque est l'agent habituel des différents modes de l'infection puerpérale, qu'on doive rapporter à une origine maternelle les lésions infectieuses observées chez les enfants. Chez eux aussi on avait noté l'abondance de la suppuration et sa tendance à la diffusion.

La réalité des ostéomyélites à streptocoques étant établie dans la pathologie humaine, il était intéressant de reproduire par la voie expérimentale des lésions semblables, afin de parfaire en quelque sorte la démonstration du rôle qui revient à ces microbes dans la pathogénie des ostéomyélites. Aussi avons-nous entrepris cette étude, en opérant dans des conditions identiques à celles qui avaient permis à M. Rodet d'obtenir chez les animaux des ostéomyélites à staphylocoques. De leur côté, MM. Courmont et Jaboulay ont poursuivi des recherches analogues [1]. Mais leurs résultats, conformes aux nôtres quant à l'existence des suppurations osseuses dans l'infection expérimentale par les streptocoques, s'en éloignent notablement pour les détails. En effet, nous n'avons point vu de différence essentielle dans la forme des lésions osseuses que produisent les streptocoques et les staphylocoques; mais nous avons noté avec les streptocoques la moindre constance des suppurations médullaires et la plus grande fréquence des arthrites; enfin nous n'avons presque pas observé d'abcès macroscopiques des reins, comme c'est le cas habituel avec les staphylocoques. Au contraire, les expérimentateurs lyonnais ont insisté sur l'absence d'arthrites et sur la localisation diaphysaire des suppurations osseuses dans l'infection par les streptocoques, et ils ont constaté, dans cette dernière, des abcès rénaux comme avec les staphylocoques.

En présence de cette contradiction dans les résultats obtenus

1. Courmont et Jaboulay, *Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë infectieuse.* Étude expérim. comparée de l'ostéomyélite à streptocoques et de l'ostéomyélite à staphylocoques: *C. R. de la Société de biologie*, 17 mai 1890, p. 274. — J. Courmont, Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë infectieuse : *ibid.*, 26 juillet 1890, p. 480.

de part et d'autre, nous croyons devoir tout d'abord préciser les conditions de nos expériences. Cela nous paraît d'autant plus nécessaire que les streptocoques présentent, dans leurs caractères morphologiques et dans leurs aptitudes pathogènes, une variabilité assez grande pour qu'on ait cru pouvoir les diviser parfois en espèces distinctes.

Les cultures qui nous ont servi dans nos recherches provenaient de sources multiples. Nous avons d'abord utilisé celles que nous ont fournies nos deux premiers cas d'ostéomyélite. Puis nous avons employé des streptocoques puisés dans divers abcès chez des enfants : une adénite parotidienne résultant d'ulcérations de phtiriase, une adénite sous-maxillaire provoquée par la gourme, une adénite cervicale développée à la suite d'une angine pultacée de la scarlatine, une adénite sous-maxillaire consécutive à une angine diphtérique. Enfin nous avons fait aussi quelques expériences avec un streptocoque puisé dans une ulcération tuberculeuse de la peau chez un adulte.

Les cultures de ces divers streptocoques, faites à la surface de la gélose, offrent un aspect pointillé; les grains sont quelquefois très fins : leurs dimensions ne dépassent pas en général celles d'une tête d'épingle, mais ils font une saillie bien nette à la surface du milieu solide. Dans certains cas les points sont beaucoup plus gros et constituent de véritables taches; il peut même arriver que la confluence des colonies donne lieu à une culture en bandelette, le long de la strie d'inoculation. Ce dernier aspect s'obtenait surtout après quelques ensemencements successifs.

Souvent les cultures, qui présentent d'abord des contours nets, s'entourent plus tard d'une série de zones concentriques, minces et transparentes, formant des bords en terrasses. Les colonies en points isolés prennent ainsi l'apparence d'une cocarde. Cet aspect ne manquait guère dans les vieilles cultures, mais quelquefois il se montrait aussi au bout de quelques jours seulement.

L'inoculation par piqûre dans la gélose ou la gélatine donne lieu à des cultures qui se développent le long de la strie, sous forme de petits grains opaques, très serrés les uns contre les autres. La gélatine n'est point liquéfiée.

Dans le bouillon, il se produit dans le cours des vingt-quatre premières heures un léger louche. Mais bientôt le liquide

redevient tout à fait clair et laisse déposer des flocons nuageux, parfois très gros, qu'une agitation un peu prolongée parvient à résoudre complètement, en donnant lieu à un trouble général du liquide.

Ces microbes poussent facilement à l'abri de l'air.

Cultivés dans le bouillon, ils se présentent à l'examen histologique sous forme de chaînettes, quelquefois très longues et formant de véritables pelotons filamenteux. Les grains de ces chaînettes sont remarquables par leur inégalité de volume et de forme. On en trouve dans la même chaînette qui sont régulièrement arrondis ou ovoïdes, à grand axe dans la direction de la chaînette, ou aplatis en sens contraire. Les divers grains d'une même chaînette fixent aussi inégalement les couleurs d'aniline.

Les animaux sur lesquels nous avons étudié les lésions produites par l'injection intra-sanguine de ces streptocoques étaient de jeunes lapins, pesant entre 500 et 1,300 grammes. L'inoculation était faite comme précédemment dans les veines de l'oreille, avec du bouillon de culture que nous avions soin d'agiter au préalable afin de résoudre entièrement les flocons déposés au fond du tube, jusqu'à ce que le liquide fût devenu uniformément trouble. La quantité injectée variait entre 0,25 de c.c. et 1^{cc}. La dose nécessaire pour produire des lésions était un peu plus forte que pour le staphylocoque orangé. Mais il faut tenir compte de cette circonstance que nos cultures étaient faites à 37° C., et que cette température n'est pas la plus favorable au développement de la virulence dans les cultures de ces microbes (Manfredi et Traversa). Nous avons pu constater que les bouillons cultivés à 27° étaient doués d'une plus grande activité et qu'ils restaient troubles plus longtemps que si la culture était faite à 37°.

La virulence des streptocoques est d'ailleurs sujette à bien des variations et s'épuise rapidement. Aussi avons-nous employé des cultures entre la première et la quatrième génération et datant habituellement de deux ou trois jours. Dans un cas, chez un lapin de 650 grammes, l'injection de 3/4 de centimètre cube de bouillon datant de deux jours, mais de neuvième génération, ne fut suivie d'aucun accident local ni général; la mort survint 18 jours après, peut-être d'une façon accidentelle, car l'autopsie

ne révéla aucune lésion, et l'ensemencement du sang demeura négatif.

A la suite des inoculations, nous avons vu apparaître l'érysipèle dans près de la moitié des cas. Il débutait quelques jours après l'injection, sur l'oreille inoculée, puis s'étendait parfois à l'autre côté. Il s'agissait toujours d'un érysipèle typique, avec rougeur, chaleur, tuméfaction générale de l'oreille et souvent phlyctènes. Cet accident s'est produit dans des cas où l'injection avait été faite sans difficulté, sans qu'une partie du liquide eût semblé fuser dans le tissu cellulaire sous-cutané, et alors même que l'oreille inoculée avait été lavée soigneusement avec une solution de sublimé. Une quantité tout à fait minime du liquide virulent suffisait donc à provoquer cet accident local. Lorsque la mort n'était pas trop prompte, la guérison de l'érysipèle avait lieu d'ordinaire au bout de quelques jours, et l'animal succombait ensuite aux autres déterminations infectieuses. En effet, dans tous les cas où l'érysipèle s'est montré, sauf un, nous avons trouvé diverses lésions du squelette, foyers osseux et surtout articulaires, précédant même l'érysipèle dans une de nos expériences, ce qui démontre bien qu'il s'agissait d'une infection générale d'emblée. Une fois seulement la mort survint dix-huit jours après l'inoculation, mais alors que l'érysipèle était guéri depuis plusieurs jours, sans que nous ayons pu constater aucune lésion à l'autopsie.

Parmi les lésions de squelette observées dans nos expériences, il faut placer au premier rang les arthrites suppurées. Souvent multiples, elles occupaient de préférence le genou. Nous avons trouvé cette jointure prise 6 fois, le coude 3 fois, l'épaule et le poignet chacun 2 fois, l'articulation tibio-tarsienne 4 fois, la hanche 1 fois. Le pus de ces arthrites est ordinairement abondant et distend fortement la synoviale articulaire (pl. VI, fig. 5). Il n'est même pas rare qu'il se produise des désordres plus considérables : rupture de la synoviale et fusées purulentes dans les parties molles du membre. Fréquemment les jointures qui ne présentent pas de pus sont le siège d'une vive injection et renferment une synovie assez abondante; nous avons pu nous assurer dans un cas, par l'examen microscopique, que cette synovie contient des chaînettes. Il peut arriver d'ailleurs que

l'inflammation articulaire n'aboutisse pas à la suppuration. C'est ainsi qu'une fois nous avons assisté à la résolution spontanée d'une arthrite : chez un lapin inoculé avec une dose relativement faible (1/4 de centimètre cube de bouillon de première génération, datant de 5 jours), il se développa un gonflement douloureux de l'épaule avec fluctuation ; puis peu à peu l'épanchement diminua et disparut. La mort étant survenue au bout de 26 jours, nous n'avons plus trouvé dans la jointure qu'une synovie très visqueuse dont l'ensemencement demeura stérile ; il n'existait aucune autre lésion du squelette, ni des viscères. Tout s'était donc borné, en fait de localisations infectieuses, à un pseudo-rhumatisme mono-articulaire et non suppuré.

Les lésions osseuses proprement dites présentaient, dans leurs traits généraux, les mêmes caractères que dans l'infection par les staphylocoques. Ce sont principalement des foyers intra-osseux que nous avons observés. Ils siégeaient surtout dans la partie inférieure du fémur, au voisinage du cartilage de conjugaison. Plusieurs fois ils s'avançaient jusqu'au contact du cartilage, qui se trouvait en partie décollé et même envahi par les colonies microbiennes. Un coup d'œil jeté sur les figures de la planche VI montrera mieux que toute description ce siège juxtaépiphysaire que MM. Rodet et Courmont considèrent comme exceptionnel. Les foyers intra-osseux siégeaient 5 fois à la partie inférieure du fémur; nous les avons encore rencontrés 3 fois à la partie inférieure du tibia, une fois à l'extrémité inférieure de l'humérus et à la partie supérieure du cubitus. Dans deux cas seulement, nous avons vu des abcès sous-périostiques sans lésion centrale de la moelle osseuse : c'étaient un abcès de la malléole externe et deux petits abcès miliaires à la surface du cubitus.

Ordinairement les abcès intra-osseux étaient en relation évidente avec les arthrites. Parfois le foyer s'ouvrait directement dans la cavité articulaire, par exemple au genou, entre le cartilage épiphysaire et la réflexion de la synoviale. Mais l'extension du processus suppuratif peut encore se faire par l'épiphyse, un foyer purulent juxta-épiphysaire traversant le cartilage de conjugaison et envahissant l'extrémité articulaire de l'os. Ainsi nous avons vu à la partie inférieure de la diaphyse du tibia, l'infiltration purulente de la moelle juxta-épiphysaire se continuer, à travers le cartilage de conjugaison, par une traînée jaunâtre, péné-

trant dans l'épiphyse, pour aboutir au cartilage diarthrodial de l'articulation tibio-tarsienne, qui était elle-même remplie de pus.

MM. Rodet et Courmont ont insisté sur la suppuration du canal médullaire, qu'ils considèrent comme la lésion la plus constante et la plus caractéristique de l'ostéomyélite à streptocoques. Dans nos expériences nous avons rencontré deux foyers purulents qui revêtaient cette forme : une fois la partie inférieure du fémur présentait une strie purulente, longue d'un centimètre (pl. VI, fig. 2), et une autre fois, dans la partie inférieure du tibia, se trouvait un abcès ovoïde, gros comme un grain de chènevis, situé comme le précédent en pleine moelle osseuse. Mais, dans chacun de ces cas, on observait en même temps l'infiltration purulente du tissu spongieux juxta-épiphysaire, l'envahissement du cartilage de conjugaison et même la suppuration de la jointure voisine. D'ailleurs ces abcès du canal médullaire se voient aussi dans l'infection par les staphylocoques (pl. III, fig. 3), en sorte qu'ils ne caractérisent nullement l'ostéomyélite à streptocoques.

La rareté des séquestres, parmi ces lésions expérimentales, mérite une mention. MM. Rodet et Courmont y insistent également. Deux fois seulement nous avons trouvé un séquestre isolé au milieu du pus, à la partie inférieure du fémur et à la partie inférieure du tibia. Rappelons à ce propos que, dans l'une de nos observations cliniques, il y avait un séquestre volumineux du sacrum.

Quant aux décollements épiphysaires, s'ils n'étaient pas complets dans nos expériences, ils étaient en voie de formation, ou du moins les altérations du cartilage de conjugaison que nous avons décrites en représentaient un premier stade. Ils existent d'ailleurs dans la pathologie humaine : une de nos observations mentionne cet accident, et M. Chipault indique que la tête du radius et l'olécrâne étaient presque entièrement décollés.

On voit, en somme, qu'il ne manque à ce tableau des lésions osseuses, produites par les streptocoques, aucun des traits fondamentaux qui caractérisent l'ostéomyélite à staphylocoques. La différence entre ces deux espèces réside surtout dans la proportion relative des diverses formes de lésions et dans leur répartition sur le squelette. Une différence importante consiste aussi dans la fréquence absolue des localisations osseuses. En effet, il n'est pas douteux que, chez l'homme, l'ostéomyélite à strepto-

coques soit notablement plus rare que l'ostéomyélite à staphylocoques, alors que les infections dues aux streptocoques sont fréquentes, en particulier dans le jeune âge. Les résultats de nos expériences concordent avec cette donnée de l'observation clinique. Nous avons obtenu moins fréquemment des lésions de la moelle osseuse avec les streptocoques qu'avec les staphylocoques. Plusieurs fois nous avons observé des érysipèles, des arthrites, sans foyers osseux. On ne saurait attribuer cette absence de lésions médullaires, comme le fait M. Courmont [1], à ce que le liquide inoculé aurait fusé dans le tissu cellulaire sous-cutané, sans pénétrer dans le courant sanguin, de manière à produire des accidents locaux sans infection générale. L'examen de nos expériences montre qu'il n'en est rien. En effet l'érysipèle, comme nous l'avons dit plus haut, s'est presque toujours développé dans les cas graves, où il existait des signes d'infection générale, des arthrites dont le début pouvait précéder l'apparition de l'érysipèle. D'autre part les lésions de la moelle osseuse ont fait défaut alors même qu'il y avait avec l'érysipèle des accidents d'infection généralisée et en particulier des arthrites intenses.

L'examen histologique des os montre des lésions tout à fait semblables à celles que déterminent les staphylocoques. On voit les mêmes amas microbiens dans la moelle osseuse et dans les canaux de Havers. On observe aussi l'accumulation des microbes dans les capillaires au voisinage du cartilage de conjugaison, l'envahissement des travées directrices de l'ossification par les colonies (pl. VI, fig. 1), et l'on peut, pour expliquer cette dernière localisation, adopter l'interprétation proposée par Bobroff [2] pour l'ostéomyélite à staphylocoques : c'est sans doute le ralentissement du courant sanguin dans les culs-de-sac des bourgeons vasculaires, au niveau de la ligne d'ossification, qui favorise l'arrêt des microbes en ce point et leur pullulation.

Un détail digne de remarque, c'est que, dans les arthrites purulentes obtenues dans nos expériences, aussi bien d'ailleurs avec les staphylocoques qu'avec les streptocoques, les cartilages articulaires ne présentaient aucune altération histologique. On

1. J. Courmont, Sur les microbes de l'ostéomyélite aiguë infectieuse : *C. R. de la Société de biologie*, 26 juillet 1890, p. 480.

2. A. Bobroff, Ueber acute infectiöse Osteomyelitis : *Wiener medizin. Presse*, 1889, nr. 8 et 9, p. 298 et 343.

trouvait parfois sur les coupes les débris de l'exsudat purulent, infiltré de microbes et adhérant à la surface libre du cartilage diarthrodial; mais ce cartilage était intact, sa substance fondamentale n'était ni ulcérée, ni envahie par les microbes et ses cellules n'offraient aucune altération. Au contraire, nous avons vu le cartilage de conjugaison, au contact d'un foyer de suppuration osseuse, se laisser envahir avec la plus grande facilité par les colonies microbiennes, qui le détruisent rapidement et le traversent de part en part pour se propager à l'épiphyse. La raison de cette vulnérabilité spéciale du cartilage de conjugaison doit être cherchée, sans doute, dans la présence des bourgeons vasculaires qui le pénètrent et qui jouent un si grand rôle dans la résorption du tissu cartilagineux, en dehors même de toute intervention des microbes. Au contraire, à la surface libre de l'articulation, le cartilage n'est pas en contact avec les vaisseaux; il offre de plus une structure très dense, il est formé de cellules aplaties, tassées en quelque sorte et disposées pour subir des frottements, et il doit à ces conditions toutes différentes de résister plus longtemps à l'invasion microbienne.

Dans les parties molles des membres, on observe souvent des synovites purulentes, des phlegmons, des abcès inter-musculaires, tout à fait semblables aux lésions produites par les staphylocoques. En outre, nous avons rencontré une tuméfaction ganglionnaire que les staphylocoques ne déterminent pas au même degré, dans la plupart des cas. Les ganglions tuméfiés contiennent des amas microbiens, surtout à la périphérie, c'est-à-dire dans la région où débouchent les lymphatiques afférents.

Les viscères, contrairement à ce que nous avons décrit pour les staphylocoques, ne présentent en général aucune altération. Les reins, dans la presque totalité des cas, n'offrent aucune lésion visible à l'œil nu. Souvent même, à l'examen histologique, ils ne sont le siège d'aucune altération, si ce n'est un état un peu granuleux et trouble de l'épithélium, et ils se montrent dépourvus de microbes. Dans d'autres cas, on y rencontre des amas microbiens et de petits abcès microscopiques. Les microbes existent surtout dans les vaisseaux, particulièrement dans les capillaires des glomérules. Tantôt le glomérule en totalité semble injecté par les microbes, tantôt quelques anses vasculaires sont seulement remplies de streptocoques. Ailleurs ces microbes sont dis-

séminés en certains points au pourtour des vaisseaux, dans les interstices des tubes, probablement dans les espaces lymphatiques. Exceptionnellement on en rencontre dans l'intérieur même des tubes. Il n'est pas rare de ne constater aucune réaction inflammatoire au niveau des amas microbiens; ou bien, s'il existe une diapédèse de leucocytes, elle nous a paru toujours modérée, l'abcès microscopique ne dépassant guère le volume d'un glomérule.

Une fois seulement nous avons trouvé un foyer rénal du volume d'un gros grain de mil, et par conséquent visible à l'œil nu, à l'union de la substance corticale et de la substance médullaire. Ce foyer était formé par une zone de nécrose au centre de laquelle se trouvait un petit abcès contenant des microbes. L'animal, qui pesait 900 grammes, avait été inoculé à la dose d'un centimètre cube de bouillon de deux jours, avec un streptocoque venant d'une ulcération tuberculeuse de la peau; il était mort au bout de 30 heures, sans présenter aucune autre lésion, ni dans le squelette, ni dans les viscères.

Une autre fois nous avons observé des stries purulentes, convergeant vers la papille, et tout à fait semblables à celles que nous avons mentionnées parmi les lésions produites par les staphylocoques. Ce sont là les seules altérations visibles à l'œil nu qu'il nous ait été donné de constater au cours de nos expériences. La rareté et la faible importance de ces lésions rénales nous paraissent faire un contraste frappant avec ce que nous avons observé, dans les mêmes conditions d'expérience, avec les staphylocoques.

Les autres viscères sont généralement indemnes. Quelquefois nous avons trouvé de petits amas microbiens dans la rate et dans le foie.

Comme nous l'avons déjà noté avec les staphylocoques, nous n'avons pas observé de dégénérescence graisseuse dans les parenchymes.

Enfin le cœur, fréquemment frappé par les staphylocoques, l'est bien moins souvent par les streptocoques. Nous avons vu quelquefois de petites ecchymoses dans ses parois. Au microscope, on trouve, dans le voisinage de ces foyers hémorragiques, des microbes infiltrés dans les interstices des fibres cardiaques; ces amas microbiens dessinent de fines traînées, anastomosées en

réseau, et semblant remplir les cavités lymphatiques. Les éléments musculaires compris dans les mailles de ce réseau microbien sont frappés de nécrose. Mais nous n'avons point trouvé de streptocoques dans les foyers hémorragiques eux-mêmes.

En somme, il résulte de la comparaison de nos expériences que les lésions produites sur le squelette par les streptocoques et les staphylocoques ont entre elles les plus grandes analogies. Les lésions viscérales, obtenues dans les mêmes conditions avec ces deux sortes de microbes, diffèrent en ce que celles des streptocoques ne présentent ni la même fréquence, ni la même intensité que celles des staphylocoques. En outre, l'érysipèle appartient en propre aux streptocoques. Quant à l'ostéomyélite, c'est-à-dire la lésion que nous avons particulièrement en vue, elle se produit moins communément avec les streptocoques qu'avec les staphylocoques ; mais, dans les deux cas, elle se montre sous la même forme anatomique. Ainsi l'expérimentation, aussi bien que l'étude des malades, montre que les staphylocoques ne possèdent pas exclusivement le pouvoir de donner naissance au processus de l'ostéomyélite aiguë.

Si l'on jette un coup d'œil sur l'histoire de l'ostéomyélite depuis les premières recherches bactériologiques, on y peut suivre assez exactement les diverses étapes par lesquelles a passé la conception pathologique des maladies microbiennes. On croyait tout d'abord qu'une maladie, bien définie cliniquement et anatomiquement, ne pouvait être produite que par un seul et même microbe : c'est ainsi qu'on chercha et qu'on décrivit le « coccus de l'ostéomyélite ». On ne tarda pas cependant à reconnaître l'identité de ce microbe avec les staphylocoques du pus. Il fallut donc modifier la conception primitive et considérer l'ostéomyélite comme une simple localisation osseuse de l'infection générale produite par les staphylocoques. C'était bien ainsi, au point de vue bactériologique, le furoncle des os, comme l'avait déjà dit M. Pasteur, non sans étonner à cette époque les pathologistes. D'ailleurs on vit se multiplier les exemples de cette pluralité des lésions produites par la même espèce microbienne : le streptocoque, par exemple, se révéla comme capable de provoquer l'érysipèle, la suppuration, l'inflammation fibrineuse, c'est-à-dire des lésions plus variées encore que celles imputées aux staphy-

locoques. Néanmoins la spécificité du microbe subsistait toujours, en ce sens que les staphylocoques étaient seuls considérés comme possédant le pouvoir d'engendrer l'ostéomyélite aiguë. Mais depuis lors, de tous côtés en pathologie, on a été amené à une manière de voir toute différente. Non seulement un même microbe provoque des lésions diverses, mais inversement une même lésion peut être produite par des microbes distincts. L'endocardite que l'on appelait infectieuse ou maligne, la pleurésie purulente, l'arthrite suppurée reconnaissent pour causes des infections variées. L'ostéomyélite aiguë ne fait pas exception à cette règle : elle peut être produite, non seulement par les staphylocoques, mais par le streptocoque, par le pneumocoque et le bacille typhique.

C'est à cette phase que se trouve aujourd'hui parvenue la question de l'ostéomyélite. Mais le sujet est loin d'être épuisé, et il y a encore bien des problèmes à résoudre dans l'étiologie de cette affection. Il y a lieu tout d'abord de rechercher les différences cliniques et anatomiques qui peuvent exister entre les variétés bactériologiques de la lésion. Sous ce rapport, l'ostéomyélite à bacilles d'Eberth peut être déjà tout à fait séparée des autres formes. Il nous a semblé que l'ostéomyélite à pneumocoques possède de son côté quelques traits particuliers. Quant à l'ostéomyélite à streptocoques, elle a, il est vrai, de grandes analogies avec l'ostéomyélite à staphylocoques, et l'étude expérimentale que nous venons de faire confirme bien cette ressemblance; toutefois, nous avons fait voir que les premiers faits cliniques présentaient un certain nombre de différences qui ont permis une fois de porter un diagnostic exact, et d'envisager par suite chaque variété à part. De nouveaux faits sont indispensables pour autoriser des conclusions mieux fondées. D'autre part, il reste à déterminer les conditions qui permettront d'obtenir expérimentalement les ostéomyélites à pneumocoques et à bacilles d'Eberth. Enfin, pour les ostéomyélites à staphylocoques et à streptocoques, bien que nous soyons en mesure de les provoquer chez l'animal, il reste encore à préciser ce qui rend le terrain favorable à la diffusion des microbes dans les voies circulatoires. Il s'agit, en effet de microbes fort répandus, qui sont les hôtes normaux de notre organisme, et le problème de la réceptivité se pose ici à propos de l'ostéomyélite, comme à propos de

toutes les autres déterminations infectieuses de ces parasites. C'est assez montrer que la question est loin d'avoir atteint le terme de son évolution, et qu'il y a encore de ce côté un vaste champ d'études pour les recherches à venir.

EXPLICATION DES PLANCHES.

PLANCHE III. — STAPHYLOCOQUES.

Fig. 1. — Coupe longitudinale du tibia. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).
a, tissu compacte.
b, canal de Havers rempli de microbes.

Fig. 2 et 3. — Extrémité supérieure de l'humérus. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).

Fig. 2. — Surface externe de l'os ; abcès sous-périostique au-dessous du cartilage de conjugaison.

Fig. 3. — Coupe longitudinale de l'os montrant l'abcès précédent qui détruit le cartilage de conjugaison et, en outre, un abcès situé en pleine moelle osseuse.

Fig. 4. — Coupe d'un rein présentant plusieurs abcès. Lapin ayant survécu 43 heures (*St. aureus*).

Fig. 5. — Surface externe du même rein.

Fig. 6. — Tibia présentant des abcès miliaires et des ecchymoses périostiques. Lapin ayant survécu 48 heures (*St. aureus*).

Fig. 7. — Infiltration purulente d'un muscle. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).

Fig. 8. — Infiltration purulente de l'épiphyse d'un condyle fémoral. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).

Fig 9. — Abcès sous-périostique du tibia. Lapin ayant survécu 43 heures (*St. aureus*).

Fig. 10. — Décollement de l'épiphyse supérieure de l'humérus avec séquestre diaphysaire. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*). S, séquestre isolé.

Fig. 11. — Séquestre dans un abcès sous-périostique, situé à la malléole externe du tibia. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*). S, séquestre.

PLANCHE IV. — STAPHYLOCOQUES.

Fig. 1. — Coupe transversale du tibia. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).
a, Périoste présentant à sa partie profonde un foyer microbien.
b, Tissu compacte de la diaphyse dont les canaux de Havers contiennent des microbes.
c, Moelle du canal central.

Fig. 2. — Coupe longitudinale du tibia. Lapin ayant survécu 5 jours (*St. aureus*).
a, Moelle du canal central.
b, Travées osseuses du tissu spongieux.
c, Foyer microbien.

Fig. 3. — Rein présentant un vaste infarctus et des abcès multiples. Lapin injecté par des doses répétées de *St. aureus*.

Fig. 4. — Coupe longitudinale du même rein.

Fig. 5. — Coupe partielle de la tête humérale montrant une infiltration purulente qui siège de part et d'autre du cartilage de conjugaison. Lapin ayant survécu 42 heures (*St. aureus*).

Fig. 6. — Infiltration purulente de l'épiphyse de la tête humérale. Lapin ayant survécu 42 heures (*St. aureus.*)

Fig. 7. — Infiltration purulente de l'épiphyse d'un condyle fémoral. Lapin ayant survécu 48 heures (*St. aureus*).

PLANCHE V. — STAPHYLOCOQUES

Fig. 1. — Abcès intra-osseux communiquant avec un abcès sous-périostique du radius (*St. albus*).

Fig. 2. — Abcès miliaires d'un muscle. Lapin infecté par plusieurs injections de *St. albus*.

Fig. 3. — Portion de la diaphyse du fémur. Lapin ayant survécu 16 jours (*St. albus*).
a, Abcès sous-périostique à la surface externe de l'os.
b, Hypérostose à l'intérieur du canal médullaire.

Fig. 4. — Rein parsemé d'infarctus et d'abcès (*St. albus*).

Fig. 5. — Infiltration purulente de la moelle osseuse dans l'épiphyse de la grosse tubérosité de l'humérus. Il existait une arthrite suppurée de l'épaule (*St. albus*).

Fig. 6. — Abcès intra-osseux et juxta-épiphysaire de la partie inférieure du tibia (*St. albus*).

Fig. 7. — Abcès sous-périostique du grand trochanter (*St. albus*).

Fig. 8. — Abcès sous-périostique au-dessous de la tête du radius (*St. albus*).

PLANCHE VI. — STREPTOCOQUES

Fig. 1. — Coupe du cartilage de conjugaison de l'extrémité inférieure du fémur. Lapin ayant survécu 8 jours.

a, Extrémité de la diaphyse.

b, Tissu osseux de l'épiphyse.

c, Cartilage de conjugaison avec les travées directrices de l'ossification dont plusieurs sont envahies par les microbes.

Fig. 2. — Extrémité inférieure du fémur. Traînée de pus dans la moelle diaphysaire et infiltration purulente du tissu spongieux au contact du cartilage de conjugaison. Un petit séquestre occupe le centre de ce foyer d'infiltration purulente. Lapin ayant survécu 8 jours.

Fig. 3. — Extrémité inférieure du fémur. Abcès situé dans la substance spongieuse de la diaphyse, détruisant le cartilage de conjugaison et empiétant sur l'épiphyse. Lapin ayant survécu 8 jours.

Fig. 4 — Extrémité inférieure de l'humérus montrant un abcès développé dans la substance spongieuse et s'ouvrant dans la cavité articulaire du coude. Lapin ayant survécu 8 jours.

Fig. 5. — Arthrite suppurée du genou. Lapin ayant survécu 10 jours. La synoviale est fortement distendue en avant du fémur et en arrière du tibia.

A. Karmanski ad nat del et chromolith.

Imp. Lemercier et Cie Paris.

Fig 1.

Fig 3

Fig 4

Fig 2

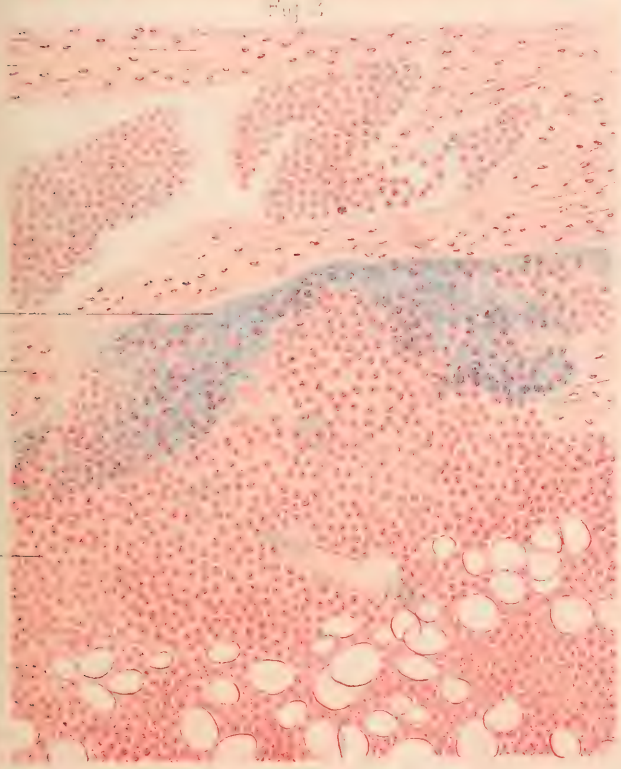


Fig 5.

Fig 6

Fig 7

A. Karmanski ad. nat. del. et chromolith.

Imp. Lemercier et Cie, Paris.

Fig. 1.

Fig. 2

A Fig. 3. B

A. Karmanski ad nat. del. et chromolith.

Imp. Lemercier et Cie, Paris

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

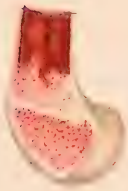


Fig. 4

Fig. 5

A. Karmanski ad. nat. del. et chromolith.

Imp. Lemercier et Cie Paris.

DE L'INFLUENCE
DE QUELQUES VARIATIONS DU TERRAIN ORGANIQUE SUR L'ACTION DES MICROBES PYOGÈNES [1]

PAR LE Dr M. HERMAN,

Ex-préparateur au laboratoire de bactériologie de l'Université de Liège.

Pour contribuer à l'étude des influences exercées par les variations du terrain organique [2] sur le développement des microbes parasitaires, nous avons choisi le *Staphylococcus pyogenes albus*, qui est facile à obtenir à l'état pur, donne des phénomènes de réaction très faciles à constater, et dont l'étude éclairera peut-être la pathogénie de la suppuration, si obscure encore malgré les travaux nombreux qui lui ont été consacrés.

C'est ainsi qu'on ne sait pas encore bien quelle est l'action des microparasites du pus, inoculés sans altération préalable des tissus. On rencontre à ce sujet les plus grandes divergences, parce que les expérimentateurs n'ont pas tenu un compte assez exact des nombreux facteurs qui interviennent dans l'action. Le *nombre* des bactéries inoculées a varié de l'un à l'autre, et on sait maintenant que ce n'est pas un élément à négliger. De même pour la *composition* des milieux nutritifs et *l'âge* des cultures. J'ai vu à diverses reprises que, toutes choses égales d'ailleurs, une culture sur bouillon de veau peptonisé était plus virulente qu'une culture du même âge sur gélose; d'autre part que de deux cultures en bouillon ayant séjourné l'une 2 jours, l'autre 13 jours à l'étuve à 37°, la dernière était beaucoup plus virulente.

1. La plupart de ces expériences, et notamment celles qui sont relatives à l'influence des sections nerveuses, sont extraites d'un mémoire inédit, présenté au Concours Académique pour la collation des bourses de voyage de Belgique, le 31 décembre 1889, et agréé par le jury. Je tiens à présenter mes plus sincères remerciements à M. le professeur Ch. Firket, pour toutes les indications précieuses qu'il m'a données, et à M. E. Malvoz, assistant d'anatomie pathologique, qui m'a constamment dirigé et aidé de ses conseils.

2. Je prends le terme de *variations du terrain organique* dans sa plus large acception, et comme embrassant à la fois les modifications que peuvent apporter les tissus divers et les changements dans la réaction d'un même tissu, suivant les agents auxquels on l'a soumis.

3. Le staphylocoque initial provenait du pus d'un abcès chaud, contracté par l'un des travailleurs du laboratoire à la suite d'une autopsie.

Pour éviter, autant que possible, toute indécision provenant de ce côté, dans mon étude sur l'influence des variations du terrain organique, je me suis efforcé d'obtenir des cultures renfermant sous le même volume des quantités à peu près identiques de microbes d'une virulence toujours égale à elle-même : j'y suis arrivé en me servant de tubes contenant 10cc de bouillon de veau neutre, préparé à la façon ordinaire avec poids égaux de viande et d'eau, et auquel j'ajoutais 2 0/0 de peptone et 1 0/0 de chlorure de sodium. On ensemençait un tube avec une culture de 2 jours, et 2 jours après ce tube servait lui-même aux inoculations et à l'ensemencement de cultures nouvelles. Tous ces ensemencements étaient faits avec la même boucle de fil de platine, et les cultures étaient conservées à 37°.

Des numérations répétées, par la méthode des plaques, ont montré que nos cultures de 48 heures renfermaient toutes à peu près la même quantité de microbes, soit 520 millions en moyenne, par centimètre cube. J'estime m'être mis ainsi dans les meilleures conditions possibles pour que mes expériences soient faites dans des conditions bien définies, et que leurs résultats soient comparables les uns aux autres.

Dans le présent travail, nous étudierons d'abord quelques-unes des *influences qui sont de nature à modifier la virulence d'un microbe pyogène inoculé en un point déterminé de l'organisme* ; en second lieu, nous rechercherons quelles peuvent être les *variations des effets observés suivant la voie choisie pour l'inoculation d'une quantité déterminée de microorganismes*, enfin nous apporterons une contribution à la question à peine effleurée jusqu'à l'heure actuelle de l'*action du système nerveux sur le mécanisme de l'infection*.

I

Effet des variations du terrain sur l'influence pyogène du staphylocoque blanc inoculé dans le tissu cellulaire sous-cutané.

Pour avoir un point de repère, nous avons d'abord dû déterminer la quantité minima de culture suffisante, en injections hypodermiques, pour produire un abcès chez une espèce animale donnée[1]. Huit lapins et 4 chiens ont reçu, par injection

1. Pour éviter des longueurs, appelons simplement cette quantité : *Coefficient de suppuration du tissu cellulaire.*

hypodermique dans la région costale, des doses croissantes de *staphylococcus albus*.

Nous avons observé que chez le lapin, il faut de 3/4 à 1 centimètre cube de notre culture pour provoquer la suppuration au point inoculé. Quatre de ces animaux, ayant reçu 1 cent. cube de culture, ont présenté invariablement des abcès. Une inoculation de 3/4 de cent. cube a amené la formation, sous la peau, d'une assez forte infiltration œdémateuse, mais pas d'abcès.

Enfin l'injection de doses inférieures (0,01, 0,05 et 0,50^{cc} de culture pure) chez 9 autres lapins n'a été suivie d'aucune réaction locale ou générale notable. Voici le détail des expériences :

NUMERO D'ORDRE	POIDS.	DATE de l'inoculation.	INJECTIONS hypodermiques de cultures pures.	DATE de l'observation.	OBSERVATIONS.
1.....	1.900	23/9	0,01^{cc}	7/10	Pendant toute la durée de l'observation, on n'a constaté aucune réaction. L'injection a été très rapidement résorbée.
2.....	2.380	—	—	—	Id.
3.....	1.480	—	0,05^{cc}	—	Id.
4.....	1.310	1/10	0,50^{cc}	15/10	Petite nodosité au-dessous du point inoculé. Cette nodosité a disparu sans suppuration. (*Cette expérience a été, dans la suite, répétée cinq fois sur d'autres lapins.* Jamais il ne s'est formé d'abcès.)
5.....	1.450	24/10	0,75^{cc}	2/11	L'animal est tué. Au point d'inoculation, infiltration de la peau et léger œdème. Les cultures de cet œdème donnent du staphylocoque à l'état pur. Les cultures des organes internes restent stériles.
6.....	2.200	25/10	1^{cc}	2/11	Une tumeur fluctuante, du volume d'une noix, siège sous la peau, un peu au-dessous du point inoculé. L'incision des téguments donne issue à un pus blanc, abondant, épais, dans lequel on retrouve, par le microscope et les cultures, le staphylococcus albus.
7.....	2.370	25/10	—	4/11	Abcès sous-cutané, du volume d'une noisette. Pus à staphylocoques.
8.....	2.300	25/10	—	4/11	Id.
9.....	2.470	25/10	—	14/2	Nodosité dure, du volume d'une noisette, se laissant parfaitement énucléer. L'incision de cette tumeur montre qu'elle est formée d'une capsule fibreuse renfermant du pus blanc, épais. Le microscope y révèle la présence de staphylocoques.

Le coefficient de suppuration du tissu cellulaire du lapin oscillerait donc entre 0,75^{cc} et 1^{cc} de la culture employée, et nous savons que 1^{cc} de cette culture renferme 520 millions de coccus.

Le tissu cellulaire sous-cutané du chien s'abcède beaucoup plus facilement que celui du lapin. Son coefficient de suppuration est de 0,10^{cc} de culture pure, environ : ce coefficient serait donc environ 10 fois plus petit que celui du lapin.

Deux chiens, de même âge et de même poids sensiblement, ayant reçu chacun une dose de 0,10^{cc} de culture pure, ont présenté, au bout de 3 jours, des abcès dans le pus duquel nous avons retrouvé le staphylocoque inoculé. Des doses plus faibles de culture (0,05^{cc}) inoculées dans les mêmes conditions à 2 autres animaux de la même espèce, ont été simplement résorbées.

Connaissant la façon de réagir du tissu cellulaire normal à l'égard du staphylocoque blanc, nous avons tâché de modifier le terrain au moyen d'agents chimiques, et d'apprécier ensuite l'action du microbe dans ce tissu altéré.

On sait depuis longtemps que l'on peut augmenter la faculté pyogène d'un microorganisme en faisant précéder l'inoculation de certains irritants chimiques. Fehleisen[1], entre autres, a obtenu des suppurations considérables avec des quantités très faibles de microbes pyogènes en pratiquant, avant l'inoculation et au même point que celle-ci, une injection d'une solution de cadavérine à 10 0/0. Dans cette voie, nous avons expérimenté avec l'acide phénique, le sublimé, les acides lactique et acétique, la glucose et les produits de culture (extrait aqueux, cultures filtrées, cultures stérilisées par la chaleur).

Nous nous bornerons à citer les expériences se rapportant à l'acide phénique et au sublimé ; celles-ci, les plus concluantes du reste, ont un intérêt pratique immédiat, nos conditions d'expérimentation pouvant se rencontrer dans une foule d'opérations chirurgicales.

Ces expériences ont été faites chez le lapin seulement, car, comme on vient de le voir, le tissu cellulaire sous-cutané du

1. Fehleisen, Sur l'étiologie de la suppuration. *Archiv. f. Klin. Chirurgie*, 1887-1888, Bd. XXXVI.

chien s'abcède trop facilement pour qu'on puisse étudier chez cet animal les variations de sensibilité pyogénique dans des circonstances diverses.

Les expériences de Steinhaus [1] demontrent que ni l'acide phénique, ni le sublimé ne sont pyogènes par eux-mêmes. Bujwid [2], de son côté, a démontré que des doses de cultures de staphylocoques dorés, trop faibles pour être pyogènes à elles seules, acquièrent cette propriété quand elles agissent concurremment avec l'acide phénique à 2 0/0 ou le sublimé à 1 0/0.

Nos expériences confirment les résultats obtenus par ces deux auteurs.

Trois lapins reçoivent chacun par injections hypodermiques 1cc d'acide phénique à 3 0/0. Une heure après, inoculation au même point de 0,10cc de culture pure, *quantité insuffisante à elle seule pour produire la suppuration.*

Après 10 jours, deux des trois animaux en expérience présentaient un abcès fluctuant du volume d'une noix; l'inflammation, beaucoup moindre chez l'autre, avait donné lieu à la production d'une petite tumeur assez dure, du volume d'une noisette.

L'incision des téguments recouvrant ces tumeurs détermina, dans tous les cas, l'écoulement d'un pus franc, d'un blanc laiteux, laissant voir au microscope une très grande quantité de coccus et dont on retira des cultures pures de staphylocoque blanc.

Deux autres lapins (témoins) reçurent respectivement au même point 1cc et 2cc d'acide phénique à 3 0/0. Ces injections ne donnèrent lieu à aucune réaction appréciable.

Le coefficient de suppuration du tissu cellulaire, altéré par l'acide phénique, serait donc au moins 10 fois inférieur à celui du tissu cellulaire normal. En d'autres termes, le tissu cellulaire normal serait 10 fois plus résistant à l'action du staphylocoque que ce même tissu altéré par l'acide phénique.

Le sublimé corrosif en solution aqueuse à 1 0/00 agit à l'instar de l'acide phénique, mais d'une façon moins marquée. Tout d'abord, le sublimé, pas plus que l'acide phénique, n'est en lui-même pyogène.

1. Julius Steinhaus, L'étiologie des suppurations aiguës. *Litterarisch-kritische, experimentelle und klinische Studien.* Leipzig, 1889.

2. O. Bujwid. Le sucre de raisin comme cause de la suppuration avec le *Staphylococcus aureus, Centralbl. f. Bact.*, 1888, n° 19.

Des injections hypodermiques de 1cc et de 2cc de sublimé à 1 0/00 ont été, chez le lapin, simplement résorbées ou bien suivies d'une nécrose plus ou moins étendue des téguments, dans le champ d'action du caustique.

En faisant suivre, à deux heures d'intervalle, l'injection de 1cc de sublimé à 1 0/00 par une inoculation de 0,50cc de culture pure, on peut provoquer la suppuration. Deux lapins ainsi opérés ont présenté des abcès à staphylocoques au point d'inoculation.

Des doses de culture inférieures (0,01 et 0,20 cc), agissant concurremment avec le sublimé, ne se sont pas montrées pyogènes dans les deux expériences que nous avons établies.

La conclusion pratique que l'on peut tirer de ces faits est que l'acide phénique étant beaucoup plus irritant que le sublimé lui sera, rien qu'à ce point de vue, inférieur dans l'application de l'antisepsie, tout au moins en ce qui concerne l'action de celle-ci sur les microbes pyogènes.

Cela explique encore pourquoi la réunion par première intention fait souvent défaut dans les opérations où les tissus ont été irrigués pendant un certain temps, au moyen de solutions d'acide phénique trop fortes.

En résumé, l'acide phénique, en altérant les tissus, peut prédisposer à une infection pyogénique subséquente.

Disons, pour terminer ce chapitre, que contrairement à *Bujwid*[1] et à *Ferraro*[2], et d'accord avec *Grawitz, de Bary*[3] et *Steinhaus*[4], toutes les expériences que nous avons entreprises avec le glycose, comme altérant des tissus, en vue de favoriser la suppuration, sont restées sans résultat.

Quatre lapins ont reçu sous la peau, et à différentes reprises, des doses variables de solution de glycose et de cultures pures de staphylocoques (naturellement en quantités inférieures au coefficient de suppuration). Dans aucun cas, il ne s'est produit d'abcès.

Le glycose ne nous paraît pas favoriser l'action du staphylocoque.

1. Bujwid, *loc. citato.*
2. Ferraro. (Action du glucose sur la virulence du *Staphylococcus pyogenes albus Rivista clinica et terapeutica*, anno XI, 1889.)
3. Grawitz et de Bary, *Virchow's Archiv*, 1887, Bd. CVIII.
4. Steinhaus, *loc. cit.*

Enfin, signalons en passant les effets des acides lactique et acétique en injections hypodermiques. Ces agents produisent des nécroses tégumentaires très étendues, ouvrant la porte aux infections secondaires. Dans aucun cas, même en combinant l'action de ces acides à celle du staphylocoque, nous n'avons obtenu de suppuration. La plupart des animaux opérés (12 lapins) sont morts de septicémie.

Quant aux produits de culture sur lesquels nous avons expérimenté, l'extrait aqueux [1] nous a paru le plus propre à favoriser l'action pyogène du staphylocoque inoculé. Par l'action altérante de cet extrait, le coefficient de suppuration du tissu cellulaire est tombé à 0,20^{cc} de culture pure.

Un lapin ayant reçu sous la peau 4^{cc} d'un extrait aqueux de culture additionné de 0,20^{cc} de culture pure de staphylocoque, a présenté un abcès au point inoculé.

Trois autres animaux inoculés dans les mêmes conditions avec la même quantité d'extrait aqueux, mais avec des doses plus faibles de culture, n'ont présenté aucun phénomène d'abcession.

II

VARIATIONS DES EFFETS SUIVANT LA VOIE D'INOCULATION D'UNE QUANTITÉ DÉTERMINÉE DE MICROBES

Dans la seconde série d'expériences, nous avons entrepris des inoculations de quantités variables de coccus par les diverses voies de l'organisme : voies intrapéritonéale, intrapleurale, arachnoïdienne, oculaire, sanguine.

Nous avons remarqué que ces injections avaient des effets éminemment variables suivant la voie choisie pour l'inoculation : tel organe (le péritoine, par exemple) supporte, sans paraître en souffrir beaucoup, 20 fois la dose qui suffit à faire suppurer tel autre organe. Nous avons, en quelque sorte, dressé une table de sensibilité à l'égard du staphylocoque, des différentes voies

1. Cet extrait aqueux a été obtenu en traitant par l'alcool absolu des produits de culture pure de staphylocoque blanc séparés par filtration à travers la porcelaine dégourdie. Le précipité, desséché dans le vide, était alors repris par l'eau distillée, en quantité aussi faible que possible.

par lesquelles les germes infectieux peuvent pénétrer dans l'organisme. Bien qu'en fait, l'organisme humain ne se trouve qu'exceptionnellement dans les conditions réalisées dans nos expériences, les résultats de celles-ci, comparés entre eux, n'en sont pas moins intéressants, au point de vue de la pathogénie de la suppuration.

A. Injections intrapéritonéales. — Comme *Grawitz*[1], *Steinhaus*[2] et beaucoup d'autres, et contrairement à *Pawlowsky*[3], nous avons pu nous assurer que le péritoine est, chez le lapin et le chien, extraordinairement résistant à l'action des staphylocoques pyogènes.

Deux lapins ont reçu chacun dans le péritoine 1cc de culture pure. Le premier a été laissé en vie et n'a présenté aucun symptôme morbide : le second a été tué 32 heures après l'inoculation. Nous n'avons pas trouvé trace de pus dans la cavité péritonéale. Les cultures des organes renfermaient exclusivement des staphylocoques.

Deux chiens traités de la même façon se sont comportés de même.

Nous devons encore ajouter que cette même dose de 1cc de culture pure (coefficient de suppuration du tissu cellulaire sous-cutané) n'a pas provoqué d'inflammation suppurée du péritoine, chez un lapin dont la séreuse avait été, 2 jours auparavant, altérée par l'injection de 1cc de sublimé à 1 0/00. Dans ce cas on constata des signes manifestes d'inflammation plastique, mais pas trace de pus.

Chez un quatrième lapin nous avons injecté, sans plus de succès, 13cc d'un filtrat de culture pure. Le surlendemain, l'inoculation de 1cc de culture pure dans ce péritoine que nous croyions avoir suffisamment altéré fut supportée sans réaction locale ou générale manifeste. L'animal a été laissé en vie. Nous sommes, croyons-nous, en droit de conclure avec *Grawitz*, *Steinhaus*, etc.,

1. P. Grawitz, Contribution statistique et expérimentale à l'étude de la péritonite. *Charité-Annalen*, 1886, Bd. XI.

2. Steinhaus, *loc. cit.*

3. Pawlowsky, Contribution à l'étiologie et au mode de développement de la péritonite aiguë. (*Centralblatt f. Chirurgie*, 1887, nº 48.)

que le péritoine résiste très bien au staphylocoque blanc, inoculé à doses relativement considérables [1].

B. Inoculations intrapleurales. Contrairement au péritoine, la plèvre suppure avec facilité.

Deux lapins sont inoculés dans la cavité pleurale droite au moyen de 1cc de culture chacun. Un troisième lapin reçoit dans les mêmes conditions le quart de cette dose.

Les trois animaux sont morts à la suite de pleurite suppurée, dans un espace de temps variant de 2 à 7 jours.

Dans les trois cas la plèvre contenait un pus abondant, épais, à staphylocoques. Dans un cas, l'inflammation suppurée se propagea au péricarde et occasionna des adhérences fibrino-purulentes entre les 2 feuillets de cette séreuse.

Nous nous sommes demandé si cette très curieuse différence de réaction de deux séreuses, en apparence bien semblables, ne tenait pas à une différence dans leur puissance de résorption. Mais ici il faut distinguer entre la résorption des microbes et celle des produits solubles contenus dans la portion de culture inoculée. Au sujet de la première, je me suis convaincu, en faisant d'heure en heure, pendant 7 heures consécutives, des prises de sang sur l'oreille de 2 lapins, inoculés l'un dans la plèvre, l'autre dans le péritoine, avec 1cc de culture pure, que le sang contenait des staphylocoques blancs, et sans qu'on pût dire, même en faisant des numérations par la méthode des plaques, de quel côté il y en avait le plus. On ne voit donc pas de différence bien sensible de ce côté. Quant à la résorption des produits de culture, il est difficile de l'apprécier. J'ai bien vu que la température rectale du lapin inoculé dans le péritoine était constamment plus élevée que celle de l'autre, ce qui semble indiquer, étant donnée la propriété pyrétogène de beaucoup de produits microbiens, que l'absorption était plus rapide par le péritoine que par la plèvre, mais il ne faut pas pousser trop loin ce genre d'argumentation, à cause des incertitudes.

C. *Inoculations intra-arachnoïdiennes.* — Deux lapins trépanés reçoivent respectivement, dans la cavité arachnoïdienne, 1/3 de

1. Des expériences récentes de Delbet (*Ann. de gynécologie*, 1891) confirment une fois de plus ces résultats.

centimètre cube de dilutions de culture pure à 10 0/0 et à 20 0/0. Un 3e est inoculé dans les mêmes conditions avec 1/3 de centimètre cube de culture pure.

Les 3 animaux ont succombé au bout de 3 à 4 jours après avoir présenté des phénomènes cérébraux très intenses : hyperesthésie, convulsions épileptiformes, spontanées ou provoquées par un léger attouchement, cris prolongés, mouvements de manège, etc.

Il n'y avait pas trace de pus à la surface du cerveau ; çà et là, au voisinage du point d'inoculation, de légères ecchymoses.

Les cultures d'organes internes renfermaient le staphylocoque. Comme pour les autres séreuses, il y a donc eu résorption de microbes par l'arachnoïde.

D. *Inoculations intra-oculaires.* — La chambre antérieure de l'œil est le milieu par excellence pour la formation d'un abcès. Trois lapins ont reçu, respectivement, dans la chambre antérieure, une injection de 3 gouttes de cultures diluées à 1 0/0, 2 0/0 et 1 0/00. Cette dernière dose contenait environ 60,000 coccus.

Dans les 3 cas, il y eut inflammation de l'œil, vive hypérémie conjonctivale et ciliaire, et formation, au bout de 1 à 3 jours, d'un hypopyon typiques, dans lequel nous avons retrouvé le staphylocoque à l'état pur.

Il suffit donc, pour produire un abcès de la chambre antérieure, d'une quantité de microbes 8,600 fois moindre que pour amener la suppuration du tissu cellulaire sous-cutané.

E. *Injections intra-veineuses.* — On sait déjà depuis longtemps que, chez le lapin, l'inoculation intra-veineuse du staphylocoque amène la mort de l'animal à la suite de lésions diverses dont les plus constantes sont les abcès des reins. Nous possédons 11 observations se rapportant aux inoculations intra-veineuses chez le lapin et chez le chien.

Sept lapins ont reçu respectivement, dans une des veines de l'oreille, 1cc de cultures diluées à différents titres : 10, 20, 30 0/0. Un lapin est inoculé de la même façon avec 1cc de culture pure.

Tous ces animaux ont présenté indistinctement et sans exception des abcès dans les reins. Dans ces abcès, en forme

d'infarctus, nous avons toujours retrouvé le staphylocoque inoculé. Le sang du cœur de ces animaux renfermait souvent des coccus, ainsi que cela a été démontré par les cultures. Ce fait s'explique en admettant que les staphylocoques qui, comme l'a démontré *Wissokowitch*, disparaissent assez rapidement du sang pour se fixer dans certains organes, envahissent secondairement la circulation quand il s'est formé, dans les reins par exemple, des foyers d'abcession qui déversent de temps à autre des microbes dans le torrent sanguin.

Quant à la localisation des staphylocoques dans le rein et la configuration des abcès, nous avons pu démontrer — au moyen de coupes — que le *locus minoris resistentiæ* est constitué par les districts rénaux soustraits à l'irrigation sanguine à cause des thromboses artérielles et capillaires constituées par les colonies microbiennes.

Les glomérules de Malpighi peuvent également devenir le siège d'une pullulation de coccus. Ceux-ci peuvent même rompre les parois capillaires, arriver dans les canalicules urinifères et de là dans l'urine, fait dont nous avons pu nous rendre compte dans un cas.

Si l'inoculation intra-veineuse d'une quantité relativement faible de culture chez le lapin entraîne toujours la mort de l'animal, le chien au contraire présente un grand degré de résistance à l'invasion des staphylocoques par la voie sanguine.

Deux chiens ont reçu, par la veine saphène, l'un 3/4 de centimètre cube, l'autre 2^{cc} de culture pure (environ 1 milliard de coccus avec leurs produits de culture). Le premier de ces animaux est toujours en vie. Le second a été sacrifié après 3 semaines et nous n'avons rien trouvé dans les organes internes, dont les cultures, du reste, sont restées stériles.

III

INFLUENCE DU SYSTÈME NERVEUX SUR LA LOCALISATION DES STAPHYLOCOQUES PYOGÈNES EN CIRCULATION DANS LE SANG.

Les remarquables travaux de *Wissokowitch* sur le sort des bactéries en circulation dans le sang ont parfaitement mis en

lumière ce fait que le sang se débarrasse très rapidement des microbes injectés. Si ceux-ci ne sont pas pathogènes, ils vont se fixer dans certains organes de prédilection comme la rate, le foie, la moelle osseuse où ils disparaissent bientôt. Si ces microbes sont capables d'amener des infections du sang, ils se multiplient dans les organes précités, et de là envahissent ultérieurement la circulation.

Nous apportons une nouvelle contribution à l'étude du rôle du système nerveux sur l'infection en démontrant que la section du nerf sciatique favorise la fixation des microbes pyogènes non seulement dans les articulations, mais encore dans la moelle osseuse et la bourse muqueuse du talon (décubitus) du membre opéré.

Nous ne pouvons passer sous silence les expériences de *Charrin* et *Ruffer* [1] et de *Roger* sur l'influence de la section du sciatique sur l'infection. Comme on le verra, nous nous sommes placé à un autre point de vue que ces auteurs.

Charrin et *Ruffer*, expérimentant sur le cobaye avec le bacille pyocyanique, ont trouvé que la section du nerf sciatique favorise, dans la majorité des cas, le développement de l'infection locale. Non seulement, disent ces savants, le gonflement et la lésion sont plus considérables au niveau des portions de membre privées de l'influence nerveuse, mais encore la mort survient plus facilement. Roger, opérant sur le lapin avec le charbon symptomatique, n'est pas parvenu, par la section des nerfs d'un membre, à produire la maladie.

Voici l'exposé de nos expériences. Nous avons sectionné le sciatique droit et réséqué une portion du nerf à une série de 15 lapins. Quatre de ces animaux sont morts de septicémie, 2 sans cause apparente le lendemain de l'opération (shok). Les 9 lapins restants, parfaitement guéris et la plaie opératoire étant complètement cicatrisée, ont reçu par voie intraveineuse des doses variables de culture de staphylocoques (0,10^{cc} — 1^{cc}).

Les sujets en expérience ont été sacrifiés à différentes, époques. L'observation des modifications observées dans leur organisme

1 Charrin et Ruffer : Influence du système nerveux sur l'infection. *Comptes rendus de la Société de biologie*, n° 10, 1889. — Charrin. Influence des modifications locales et générales du terrain sur le développement de l'infection. *Id.*, n° 30, 1889.

nous conduit aux conclusions suivantes (voir le tableau ci-dessous) :

NUMEROS D'EXPÉRIENCE	Poids de l'animal.	Quantité de culture inoculée.	DATES De la sect. du sciatique.	DATES De l'inoculation.	DATES De l'examen.	Genou énervé.	Genou normal.	Articulation tib.-tars. énervée.	Articulation tib.-tars. normale.	Moelle osseuse : côté énervé.	Moelle osseuse : côté normal.	Bourse du talon : côté énervé.	Foie, rate, rein.
1.....	1.850	1cc	17/10	26/10	26/10	+	—	—	—	»	»	—	+
2.....	1.730	0,10cc	—	—	29/10	+	—	—	—	»	»	—	+
3.....	1.480	0,20cc	—	—	4/11	—	—	+	—	»	»	Abcès.	+
4.....	1.330	0,20cc	3/11	16/11	17/11	+	—	—	—	»	»	—	+
5.....	1.825	0,30cc	—	—	1/12	—	—	+	+	»	»	Abcès.	+
6.....	2.000	1cc	25/1	7/2	7/2	—	—	—	—	+	+	—	»
7.....	2.200	1cc	—	—	11/2	—	—	+	—	+	—	—	»
8.....	1.950	1cc	—	—	18/2	—	—	—	—	+	—	—	+
9.....	1.800	0,50cc	10/11	26/11	28/11	20 col.	1 col.	15 col.	—	30 col.	5 col.	—	+

OBSERVATIONS

1. A été tué 6 heures après l'inoculation.
2. Abcès en forme d'infarctus dans le rein.
8. Abcès volumineux aux reins.
9. Abcès rénaux, avec staphylocoques. On trouve également des coccus dans le sang du cœur. Les chiffres du tableau sont les nombres de colonies obtenues sur plaques, par ensemencement du suc des organes recueilli au moyen d'une boucle de fil de platine.

1° Dans la moitié des cas, le staphylocoque injecté dans le sang envahit assez rapidement (au bout de 1 à 3 jours) les articulations soustraites à l'action nerveuse, à l'exclusion des autres. Le liquide articulaire du membre dont le sciatique est coupé est ordinairement plus abondant que le même liquide dans les articulations du membre homologue.

Une fois, le liquide articulaire du genou énervé était constitué par un mélange de synovie et de pus, dans lequel nous avons retrouvé un amas de staphylocoques.

2° Au bout d'un certain temps (5-15 jours), les articulations non énervées peuvent aussi être envahies par les coccus. Deux faits positifs viennent à l'appui de cette proposition ;

3° La moelle osseuse énervée est ordinairement plus rouge, moins graisseuse que son homologue.

Seule elle renferme des coccus, ou, quand les moelles des 2 fémurs en contiennent, il y a toujours une prédominance marquée pour le côté opéré.

4° Dans deux cas, il s'est formé au talon du membre énervé un abcès assez volumineux, fluctuant, sous cutané dont on a retiré le staphylocoque à l'état de pureté ;

5° A deux reprises, il s'est formé du pus dans le tissu jeune de la cicatrice, au point de section du sciatique.

Nos expériences portant sur un nombre de 120 animaux nous autorisent à tirer les conclusions suivantes :

1° Le tissu cellulaire sous-cutané du lapin devient le siège d'un abcès, quand on y injecte au moins 1/2 milliard de *staphylococcus pyogenes albus* contenus dans leur bouillon de culture, celle-ci étant âgée de 2 jours et conservée à l'étuve à 37° ;

2° Certaines substances chimiques, sans être pyogènes elles-mêmes, favorisent à des degrés divers l'action du staphylocoque blanc. Nous citerons : l'acide phénique à 3 0/0, l'extrait aqueux des cultures de staphylocoque, et le sublimé à 1 0/00 ;

3° Les effets de l'inoculation du staphylocoque blanc sont éminemment variables suivant la voie choisie pour son introduction dans l'organisme ; les divers tissus de l'organisme présentent des degrés de résistance très différents à l'action de ce microbe. Nous citerons, par ordre de sensibilité : la chambre antérieure de l'œil, l'appareil circulatoire du lapin, le tissu cellulaire sous-cutané du chien, la plèvre, les méninges, le tissu cellulaire sous-cutané et le péritoine du lapin ;

4° La section du nerf sciatique favorise, dans les différentes parties du membre énervé (articulations du genou et tibio-tarsienne, moelle osseuse, bourse séreuse du talon, tissu de la cicatrice opératoire), la localisation des staphylocoques en circulation dans le sang.

REVUES ET ANALYSES

LE FILTRAGE DES EAUX DE FLEUVE

REVUE CRITIQUE

M. Belgrand, La Seine, *Paris*, 1872. — Brunhes, Variation de la température de l'air et des eaux du fleuve à Toulouse. *Mém. de l'Ac. des Sc. de Toulouse*, 1883. — Hoffmann, Nappe souterraine et humidité du sol. *Archiv. f. Hyg.*, 1883. — Soyka, Recherches expérimentales sur les oscillations du niveau de la nappe souterraine. *Prag. med.-Woch.*, 1885. — Soyka, Le sol. *Handbuch d. Hyg.* — Clavenad et Bussy, Mémoire sur la filtration. *Annales des ponts et chaussées*, mars 1890. — Arloing, Sur le projet d'amélioration et d'extension du service des eaux de la ville de Lyon. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, t. XIII, 1891. -- Jouon, L'eau filtrée à Nantes. *Id.*, p. 119.

Nous avons étudié l'an dernier dans ces *Annales* (t. IV, p. 41) les conditions de filtration des eaux au travers des filtres industriels qui servent à l'alimentation des grandes villes. Il est une autre source à laquelle on puise souvent l'eau nécessaire aux grandes agglomérations. On utilise l'eau des fleuves que la Providence a eu soin de faire passer dans les villes populeuses et on ouvre, dans les graviers des berges, des galeries plus ou moins longues, dans lesquelles on se flatte de recueillir l'eau du fleuve, purifiée par une filtration au travers du sable ou du gravier. Généralement on trouve ainsi de l'eau : on trouve même qu'elle est à un niveau supérieur à celui de la rivière, si bien que si on se contentait de la prendre sans abaisser son niveau, on serait certain de ne pas recueillir une goutte d'eau provenant du fleuve. Mais on admet qu'en abaissant notablement le niveau de la tranchée, on produit un appel, et qu'on a ainsi de l'eau filtrée au travers des bancs de sable plus ou moins épais qui séparent la galerie de la rivière.

Cette opinion est soutenue par plusieurs ingénieurs distingués, qui l'ont appuyée de faits d'observation ou d'expérience. Elle a pour elle la vraisemblance, et on ne saurait l'écarter *a priori*. Seulement il ne

faut pas non plus la considérer à l'avance comme si exacte qu'on n'ait même pas à viser l'opinion contraire : c'est une question à examiner à nouveau toutes les fois qu'elle se pose, car elle peut avoir les solutions les plus variées. Je crois utile de résumer une fois de plus tout ce qu'on sait sur elle, et de tirer de ce résumé quelques règles pratiques pour se faire une opinion dans chaque cas particulier.

C'est à Belgrand qu'il faut remonter pour trouver les premières idées justes sur la matière. Le livre magistral, *La Seine*, dans lequel il a condensé l'expérience de sa carrière d'ingénieur, fournit un exemple remarquable de ce que peuvent la méthode, l'esprit de suite, et le travail pour la solution d'un problème aussi compliqué et en apparence aussi inabordable que l'étude hydrologique du bassin d'un grand fleuve. C'est là qu'on trouve tracé pour la première fois avec netteté le rôle de la nappe souterraine, formée de la portion des pluies qui s'infiltre dans les terrains perméables. Cette nappe est le plus souvent composée de plusieurs couches, dont la supérieure, circulant dans les terrains meubles les plus voisins de la surface, est d'ordinaire désignée sous le nom de nappe d'eau des puits. Au-dessous de celle-ci, d'autres peuvent couler quelquefois dans des sens différents, chacune suivant les lignes de plus facile pénétration et ne s'arrêtant que lorsque se rencontre une couche imperméable.

Ces nappes n'existent pas partout. On n'en trouve naturellement pas ou presque pas dans les terrains imperméables, où la pluie coule à la surface du sol sans pénétrer plus loin que la portion ameublie par la culture ou la couche détritique superficielle. Dans les terrains perméables et absorbants, la nappe souterraine n'a pas partout la même physionomie, et ses dispositions varient suivant la nature des terrains. Dans les terrains calcaires, il n'y a plus même à proprement parler de nappe. Les infiltrations se font par les fissures, les failles, les lits de stratification. En allant visiter une des galeries de captation des sources de la Vanne à Armentières, j'ai constaté avec surprise que les parois de la galerie étaient presque sèches, même que certaines fissures ne donnaient pas une goutte d'eau, pendant qu'à côté on voyait jaillir de la roche des jets d'eau de la grosseur de la cuisse. On comprend que des puits creusés dans ces terrains puissent passer à quelques mètres d'une fissure aquifère et ne pas donner une goutte d'eau.

Il en est autrement dans les terrains sablonneux. Ici les nappes d'eau sont toujours continues : on est toujours sûr de trouver de l'eau en y creusant un puits, et d'autant plus d'eau qu'on creuse davantage, tant qu'on reste dans le sable.

Un autre point que M. Belgrand a aussi bien mis en évidence, c'est que ces nappes souterraines, pour rester ainsi à l'état de mouvement

continu dans le sol, n'ont pas besoin d'être supportées par une couche imperméable sur laquelle elles coulent comme sur un lit. Sans doute cette couche imperméable intervient quand elle existe : elle garde les eaux à son niveau, et quand elle est entamée par une vallée qui la coupe, et la laisse à flanc de coteau, sa ligne d'affleurement dessine sur les contours du coteau ce *cordon de sources* dont j'ai parlé (ces *Annales*, t. IV, p. 172). Telles sont les sources du niveau de l'argile plastique, des marnes vertes. Mais toutes les sources ne viennent pas au jour en coulant sur un terrain imperméable, et comme nous arrivons à celles qu'on est le plus exposé à rencontrer dans les galeries de filtration des fleuves, on nous permettra d'insister un peu.

Représentons-nous avec Belgrand une vaste plaine de craie à peu près horizontale comme la Champagne, dans laquelle s'infiltre toute la portion de pluie qui n'est pas reprise par l'évaporation. Cette pluie y descend jusqu'à ce qu'elle ait trouvé la couche imperméable de la craie marneuse; mais si la plaine est creusée par des vallées telles que celles de l'Aube et de la Marne, il ne sera pas nécessaire que ces vallées descendent jusqu'au niveau de la craie marneuse pour que les couches humides qui les dominent se ressuient en y versant leurs eaux, pas plus qu'un drain n'a besoin de reposer sur une couche d'argile pour collecter la plus grande partie des eaux superficielles. La nappe d'eau en voie de descente dans les profondeurs, rencontrant des pentes ouvertes à l'air libre, s'y réunira sous forme de sources, ce qui veut dire en somme que les vallées principales, et même les vallées secondaires constitueront des drains naturels, vers lesquels afflueront les eaux absorbées par les plateaux.

Ces terrains perméables se comportent donc vis-à-vis d'une partie des eaux qu'ils reçoivent comme des terrains imperméables. Ces derniers forcent les eaux à un ruissellement superficiel sur les lignes de plus grande pente, qui les amènent dans le temps le plus court au fond des vallées. Les terrains perméables remplacent par un parcours souterrain ce parcours superficiel, mais une partie des eaux qu'ils ont absorbées n'en reviennent pas moins au fond de la vallée sous forme de sources. Seulement ces sources, au lieu de se trouver éventuellement suspendues à flanc de coteau, comme celles qui circulent sur une couche imperméable, ont toujours leurs points d'émergence à peu de hauteur au-dessus du thalweg, et de préférence naturellement dans les vallées les plus profondes.

On s'explique dès lors bien que les fleuves et même certaines rivières, qui sillonnent encore aujourd'hui le lit de grandes dépressions remplies de couches calcaires dans les temps géologiques, soient accompagnées sur leurs rives et jusque dans leur lit, de ces nappes d'eau souterraines et de ces sources dont nous venons d'examiner le mécanisme de for-

mation. Une galerie latérale de filtration, surtout si on en abaisse le radier, est exposée à les recevoir au lieu de celles du fleuve, et dès lors, si l'ingénieur peut se déclarer satisfait, parce que la question d'origine l'intéresse peu si l'eau est jugée potable, l'hygiéniste doit ouvrir l'œil et se préoccuper de l'origine de ces eaux souterraines.

Si c'est vraiment l'eau du fleuve qui pénètre dans la galerie, cette origine est claire. On peut mesurer le débit du fleuve, calculer le degré de viciation auquel l'amènent les villes, les habitations ou les industries riveraines, mettre en balance les avantages et les inconvénients financiers et hygiéniques de la captation, enfin faire un calcul où il entre bien quelques éléments hypothétiques, mais dont les grands éléments sont pourtant assez exactement connus. Tout le monde ne fait pas le calcul de la même façon, parce que tous n'ont pas la même confiance dans les données et ne donnent pas le même poids aux divers éléments du problème. C'est ainsi que, s'il faut en croire M. Jouon, la ville de Nantes n'a pas hésité en 1857 à puiser directement son eau d'alimentation dans la Loire, et cela à quelques mètres en aval de l'égout d'un grand cimetière et sous des latrines publiques. Mais si une population a, dans une certaine mesure, le droit de s'exposer au danger qu'elle voit, elle a aussi celui de n'être pas exposée à un danger qu'elle ne voit pas, et tel est le cas possible quand l'eau des galeries de filtration provient non du fleuve, mais de la nappe souterraine.

Il est vrai de dire en général de celle-ci que tant à cause de son volume parfois énorme que de la filtration fine qu'elle subit dans les couches poreuses du sol, elle est plus souvent très pauvre en microbes, même quelquefois absolument privée de germes vivants. Mais localement, quand elle passe sous un groupe d'habitations, qu'elle reçoit par infiltration des eaux ménagères, des eaux d'égout ou de latrines, elle peut devenir dangereuse et apporter des germes dangereux dans la canalisation. Il faut donc, quand on est exposé à la recevoir dans des galeries de filtration établies au voisinage d'un fleuve, faire l'inspection des abords, examiner, tant au point de vue géologique qu'au point de vue géognostique, la pente générale, la direction, les lignes de parcours de la nappe souterraine, au moins à quelques kilomètres au voisinage de la galerie, bref faire une étude très soignée de la région environnante. Pour cela, la première condition est de ne pas considérer le problème comme résolu, et la nappe souterraine comme absente ou négligeable. C'est le contraire qui est vrai, et la solution la plus générale du problème est celle qui est contenue dans cette phrase de Belgrand, à laquelle M. Renou, que j'ai interrogé à ce sujet, s'associe pleinement : « L'eau des galeries filtrantes provient en grande partie des nappes d'eau souterraines. » Il se peut

que cela ne soit pas vrai partout, mais c'est un fait à démontrer dans chaque cas.

Peut-être ne sera-t-il pas inutile d'énumérer les divers éléments qu'on peut faire intervenir dans l'étude de ce problème, et d'apprécier leur valeur relative. Il y a quelque chose à ajouter sur ce point aux indications de Belgrand.

La question à résoudre est la suivante : par quels moyens peut-on se convaincre que l'eau d'une galerie de filtration creusée le long d'un fleuve est l'eau du fleuve lui-même ? Il y en a un qui vient tout de suite à l'esprit et qui, chose singulière, a été bien rarement employé : c'est la comparaison des analyses chimiques des deux eaux. Il est clair que si ces analyses révèlent des différences de composition notables, ou bien encore la présence en quantités sensibles dans l'une des eaux d'un élément rare ou absent dans l'autre, la conviction s'impose, surtout si l'eau de la galerie ressemble par sa composition à celle des puits du voisinage. Mais, en général, on ne trouve pas de différences très tranchées, parce que le fleuve étant fait, en partie au moins, de nappes souterraines qui l'ont rejoint en amont de la galerie, doit contenir les mêmes éléments que ceux que cette nappe lui apporte au niveau de la galerie. Il faudrait pour qu'il en fût autrement que le régime d'alimentation du fleuve ou de la rivière variât à très peu de distance en amont de la galerie, qu'il fût fait par exemple, jusque-là, d'eaux circulant dans des terrains imperméables et relativement peu chargées de sels, et qu'ensuite viennent s'y mêler des eaux d'infiltration, d'ordinaire plus minéralisées. Mais précisément dans ce cas, une différence de composition chimique entre l'eau du fleuve et celle de la galerie n'aurait aucune signification absolue, et il faudrait y regarder de près pour conclure. Les eaux du fleuve sont alors sujettes à des variations de composition rapide, à raison du caractère torrentiel des eaux qui les alimentent dans les terrains imperméables, et il pourrait se faire que l'eau recueillie à un moment donné dans le fleuve ne puisse pas être comparée à l'eau qu'on va recueillir dans la galerie au même moment, mais qui a pu être empruntée au fleuve la veille ou l'avant-veille.

C'est sans doute pour ces raisons, et aussi parce qu'une analyse chimique précise est longue et difficile, que Belgrand, et un grand nombre d'ingénieurs après lui, ont substitué à l'analyse chimique une simple analyse hydrotimétrique. Cette méthode est affectée, comme on sait, d'une sorte d'incertitude générale qui peut inspirer la méfiance ; mais, à la condition de ne l'écouter que lorsqu'elle parle clairement, on peut en tirer des renseignements précieux.

Ainsi, dans une analyse comparative des eaux de la Seine et de

celles d'une galerie de filtration dans laquelle la ville de Fontainebleau puise ses eaux, Belgrand a trouvé, pour les titres hydrotimétriques :

Eau de la galerie.	21°,20
Eau du fleuve.	16°,75

et les eaux de la galerie se rapprochaient beaucoup de celles des sources voisines, dont les titres hydrotimétriques variaient entre 19°,60 et 28°,80. Belgrand a eu le droit d'en conclure que les galeries s'alimentaient à peu près exclusivement au moyen de la nappe souterraine.

Mêmes conclusions pour Nevers qui s'alimente dans un puisard creusé sur la rive gauche de la Loire, au milieu des alluvions de la plaine, et où M. Rozat de Mandres a trouvé des titres de 4°,96 dans l'eau de la Loire, de 20°,70 dans celle du puisard. Mêmes conclusions encore pour Blois où les chiffres ont été de 7°,76 dans l'eau du fleuve, de 14°,45 dans l'eau de la galerie.

Les différences diminuent. Elles diminuent encore plus pour Toulouse, où les chiffres ont été dans une expérience de 13°,31 dans le fleuve, de 15°,92 dans la galerie. A Lyon, les différences diminuent encore et même sont en sens inverse. Le 28 janvier 1860, M. Belgrand a trouvé pour les titres hydrotimétriques :

Eau puisée dans le Rhône.	16°
— dans la galerie filtrante	17°,94
— dans un autre bassin de filtration . . .	18°,43
— dans un puits du voisinage.	23°,77

D'un autre côté, on trouve dans le rapport de M. Arloing les chiffres suivants, pour les moyennes résultant de nombreuses analyses pratiquées dans le laboratoire de la voirie et le laboratoire municipal :

Eau des galeries de Saint-Clair.	13°,48
Eau du Rhône.	14°,77

On pourrait dire à ce propos que des moyennes n'ont pas grande signification, et qu'il eût été plus utile de donner les différences journalières, d'autant plus probantes qu'elles sont plus grandes, et qui s'effacent quand on les fond dans une moyenne. Toujours est-il qu'on a le droit de conclure, tant des chiffres de M. Belgrand que des autres, que l'influence de la nappe souterraine est évidente [1]. C'est son *quantum*

1. Telle est aussi la conclusion à laquelle arrivent MM. Clavenad et Bussy, à la suite d'expériences de filtration très bien conduites, mais dont je n'accepte pourtant pas tous les résultats. D'après eux, le débit de la nappe aquifère est de 300cc par seconde et par mètre courant de galerie; c'est environ le sixième de ce que donne la

seulement qui reste indécis. Mais ce quantum a en somme peu d'importance. Il suffirait à la rigueur que l'eau de lavage d'une seule fosse d'aisance s'écoulât dans les galeries pour que l'eau, je ne dis pas *devienne* dangereuse, mais *puisse devenir* dangereuse.

Ces variations positives ou négatives du titre hydrotimétrique pendant la filtration ont été souvent expliquées par un dépôt ou un emprunt de matériaux aux parois de la couche filtrante. La chose est possible, mais c'est là encore une vérité sur laquelle on n'a pas le droit de tabler *à priori*, et qu'il faut accompagner d'une démonstration. D'une manière générale, on peut dire qu'elle n'a pas pour elle la vraisemblance qui résulte des faits acquis. Lorsqu'une eau est fortement chargée de bicarbonate de chaux, ce qui amène une élévation notable du titre hydrotimétrique, on sait que l'agitation au contact de l'air, ou bien encore une filtration au travers d'un amas de gravier suffit à lui retirer sa propriété d'être incrustante ou pétrifiante. Mais M. Belgrand a fait voir qu'on n'arrivait qu'avec la plus grande peine à abaisser ainsi le titre hydrotimétrique au-dessous de 18 à 20°, et que tant qu'une eau ne dépassait pas ce titre, sa composition restait stable. Les exemples qu'il a fournis de ce fait sont tellement nombreux et tellement variés qu'ils suffisent à emporter les convictions. de sorte qu'on peut admettre comme fait général, et sauf exceptions qui nécessitent une étude spéciale, que la filtration ne doit pas faire varier du tout le titre hydrotimétrique d'une eau.

On peut appuyer cette notion de l'exemple du puits Lefort, creusé à titre d'essai, à Nantes, pour savoir si on pouvait compter sur le fleuve pour l'alimentation d'eau. Ce puits est creusé dans une île dont le sol est presque uniquement formé d'un sable quartzeux et feldspathique à grains fins. Il est entouré en outre, dans sa partie supérieure, d'un épais massif artificiel formé du même sable. Enfin, au contraire de ce qui se passe d'ordinaire, les parois sont étanches et percées seulement de sarbacanes latérales placées à des niveaux différents, et qu'on peut ouvrir et fermer à son gré. Quand elles sont fermées, le puits ne reçoit pas d'eau. Il semble bien qu'on se soit ainsi mis en garde contre toute intervention possible d'une autre eau que celle du fleuve. L'étude de cette eau, conduite d'une façon tout à fait méthodique, a montré en effet qu'elle avait exactement la même composition chimique que celle de la Loire. Quant aux titres hydrotimétriques, ils se sont trouvés coïncider exactement aussi dans les limites des causes d'erreur de la méthode, ainsi que l'indiquent les nombres suivants.

galerie quand elle travaille sous une charge de $0^m,50$. Pour diverses raisons, je crois ce chiffre trop petit ; mais peu importe, l'essentiel est qu'il y ait une proportion sensible de l'eau d'alimentation empruntée à la nappe souterraine.

		Eau de Loire.	Eau du puits.
6 décembre	1889	»	11°
11 —	—	11°	»
8 janvier	1890	10°	10°,5
20 mai	1890	11°,6	11°,7
29 mai	1890	8°	8°,1

L'analyse du 8 janvier montre seule une différence sensible. Mais comme les parois du puits sont en béton, et qu'on ne nous dit pas si l'eau du puits y était restée longtemps avant la prise, nous pouvons ne pas tenir compte de cette différence, du reste minime, et conclure que l'identité de composition chimique et de titre hydrotimétrique ne permet de soupçonner aucune intervention de la nappe souterraine dans l'eau du puits Lefort.

Nous en avons fini avec le titre hydrotimétrique, et nous rencontrons devant nous l'étude non moins nécessaire de la température. Généralement, les eaux des puits riverains et des galeries filtrantes sont plus fraîches l'été, plus chaudes l'hiver que l'eau des fleuves, et généralement aussi on met ces différences de température sur le compte des masses filtrantes, qui, conservant toujours à peu près la même température, les rafraîchiraient l'été, les réchaufferaient l'hiver.

Voilà encore une notion qui a beau être acceptée généralement, elle n'en est pas plus sûre. Elle est peut-être exacte dans quelques cas, elle est sûrement fausse dans d'autres, et ma conclusion est toujours la même : méfions-nous et regardons. On peut prévoir qu'à raison de son énorme chaleur spécifique, l'eau se réchauffe et se refroidit avec une lenteur extrême, et l'expérience industrielle donne raison à cette conclusion. Les eaux d'Arcueil, qui ont à parcourir de Rungis à Paris un trajet d'environ 13 kilomètres, et dont le volume en été ne dépasse pas 12 à 15 litres par seconde, se réchauffent pendant l'été et se refroidissent pendant l'hiver sur les maçonneries de l'aqueduc, qui participent largement aux variations de température extérieure, mais leur variation de température n'atteint que rarement 1°. Celle de l'eau de la Dhuis, qui parcourt un aqueduc de 130 kilomètres de longueur, est au maximum de 2° en été, de 1° en hiver. Les eaux ont eu dans le trajet le contact d'un volume énorme de sol ou de maçonnerie, mais se défendent bien, comme on voit, contre leur influence. Il en est de même dans les tuyaux de conduite. A Paris, au travers des trajets les plus longs de la distribution de la ville, la plus grande variation constatée n'a jamais dépassé 2°,6 [1], et encore cette variation corres-

1. Belgrand cite pourtant (*La Seine*, p. 476) une variation de 3°,6, mais, en se rapportant au tableau, on constate qu'il y a eu erreur de chiffre : 28° le 16 juin 1885

pondait à une température extraordinaire de 28° au point de départ.

C'est que d'ordinaire, c'est l'eau qui impose sa température au milieu dans lequel elle coule, et non le milieu qui lui donne la sienne. On devine pourquoi. Sa chaleur spécifique est cinq ou six fois plus grande que celle des matériaux du sol ou des constructions. Au point de vue des échanges de chaleur, c'est absolument comme si le poids de l'eau était quintuplé par rapport à celui des corps en contact. Quant aux pertes ou aux gains de chaleur par conductibilité, on sait qu'ils se font heureusement avec une lenteur extrême, et il suffit souvent de mettre en rapport le volume du filtre avec celui du liquide qui le traverse pour voir combien est problématique l'influence du premier sur le second.

Voici par exemple l'eau de Lyon, puisée à Saint-Clair dans des galeries filtrantes de 500 mètres de longueur environ, creusées sur la rive droite du Rhône. L'épaisseur de la paroi filtrante est faible. « Lorsque le Rhône coule à pleins bords, elle est de 25 mètres en face de l'usine Saint-Clair; de 2 à 3 mètres sous le pont du chemin de fer, d'une douzaine de mètres en amont, et même moins. » Donnons à l'ensemble, pour tenir compte des talus lorsque le fleuve baisse, une épaisseur moyenne de 25 mètres. Donnons à la couche filtrante une épaisseur de 4 mètres, ce qui est certainement exagéré : cela nous donne 100 mètres cubes par mètre de longueur, ou 50,000 mètres cubes sur toute la longueur de la galerie. C'est précisément le cube d'eau extrait chaque jour. Ainsi le volume d'eau qui traverse le filtre chaque jour est approximativement égal au volume du filtre s'il ne lui est pas supérieur. Il est évident que dans ces conditions la température du filtre ne saurait être différente de celle de l'eau qui le traverse.

Cette eau qui a pénétré dans les galeries y rencontre une réserve des jours précédents, qui pourrait modifier sa température. Mais cette réserve a filtré dans les mêmes conditions, avait aussi la température du filtre, et ne l'a que très peu modifiée pendant le temps de son séjour. Les expériences de M. Belgrand sur les bassins de Ménilmontant, faites pendant le siège de Paris, à un moment où le bassin ne contenait qu'une réserve de 100,000 mètres cubes d'eau non renouvelée, l'aqueduc de la Dhuis ayant été coupé par l'ennemi le 15 septembre 1870, ont montré que la température n'avait pas varié de 3° depuis le milieu de septembre jusqu'au milieu de décembre. On ne peut donc pas compter sur le sol ni la couverture des réservoirs pour des échanges de chaleur, et l'eau qui pénètre dans les galeries y conserve au moins pendant quelques jours sa température.

au bassin de Chaillot; 25°,4 le 17 juin à l'arrivée à la fontaine marchande de Boule-Rouge. Différence 2°,6 au lieu de 3°,6.

D'un autre côté, les courbes dressées par le service des eaux montrent qu'entre la température de l'eau des galeries et celle du Rhône, il existe une différence moyenne de 8°. Il me semble qu'il n'en faut pas plus pour démontrer que l'eau des galeries provient en grande partie d'une autre source que le fleuve.

Nous arriverions à des conclusions analogues pour les eaux de Toulouse, dont la différence de température avec les eaux de la Garonne est pourtant un peu moindre en moyenne que pour Lyon, attendu qu'elle ne dépasse pas 6° d'après les chiffres publiés par M. Brunhes.

Pour celles de Nantes, il y a encore une différence de température de 4° d'après le rapport officiel, et cette différence est en désaccord avec la conclusion que nous avons tirée plus haut, que l'eau du puits Lefort provient directement du fleuve. Mais il faut noter qu'il s'agit ici d'un puits d'essai, de faible dimension, et non en service régulier. Le rapport que j'ai sous les yeux ne mentionne que la valeur des températures sans dire comment elles ont été prises. Il n'y a donc pas à insister pour le moment. On peut pourtant prédire, sans s'aventurer beaucoup, que si des puits analogues au puits Lefort étaient mis en service régulier et un peu actif, ce ne serait pas leur épaulement tronconique de sable, de 10 mètres de largeur sur sa base supérieure, qui empêcherait la température de l'eau du puits de suivre de très près celle de l'eau du fleuve.

Enfin, comme exemple d'une coïncidence plus étroite entre la température du fleuve et celle des galeries de filtration, je citerai l'exemple d'une des galeries creusées par d'Aubuisson pour l'établissement des fontaines de Toulouse, galerie qui était trop près du fleuve, comme d'Aubuisson le devina lui-même en constatant que sa température diminuait l'hiver jusqu'à n'être que de 2°, et se relevait dans l'été au-dessus de 20. Tel serait en effet le sort des galeries qui ne recevraient que de l'eau des fleuves, et comme de pareilles variations seraient inacceptables, il faut conclure que les galeries existantes et acceptées reçoivent toutes une proportion notable d'eaux rafraîchies par un long parcours souterrain.

Telle est encore la conclusion à laquelle nous arriverions en étudiant côté bactériologique du problème. Mais ici je peux abréger, en renvoyant le lecteur à la Revue critique que j'ai publiée l'an dernier dans ces *Annales* (t. IV, p. 232). L'eau de la nappe souterraine, après un parcours plus ou moins long à l'abri des eaux superficielles, est le plus souvent exempt de microbes. Quand on en trouve dans l'eau d'une galerie, c'est qu'il en est venu de l'extérieur. Quand on en trouve moins que dans l'eau du fleuve voisin, ce qui est d'ordinaire le cas, c'est que les galeries contiennent un mélange d'eau du fleuve et des eaux

souterraines. Il est un peu illusoire de compter que la diminution observée est due uniquement à l'influence du filtre. On sait, en effet, maintenant (V. ces *Annales*, t. IV, p. 41), que le fonctionnement de ces filtres à sable est tout à fait différent de ce qu'on croyait autrefois. Il exige un repos à peu près parfait dans l'eau qui doit filtrer, et ce repos ne se rencontre pas dans les fleuves. Il faudrait même le fuir si on le rencontrait localement. On recherche, en effet, les eaux courantes pour l'établissement des filtres, on compte même sur le courant pour rafraîchir constamment la surface des sables filtrants, et empêcher l'encrassement et la diminution de débit du filtre. Belgrand ne croyait déjà pas cette idée juste : il faisait remarquer que si le fleuve opérait le nettoiement du filtre naturel en remuant les graviers qui en forment la superficie, les matières en suspension, entraînées par l'eau même qui filtre, pénétreraient plus profondément dans la masse de ces graviers, et en oblitéreraient rapidement et d'une manière irrémédiable tous les canaux. Les idées nouvelles sur le fonctionnement des filtres sont d'accord avec cette conclusion, et il demeure, je crois, établi par cette longue discussion, que les galeries de filtration des fleuves sont plus exposées d'ordinaire à recevoir les eaux de la nappe souterraine que celles du fleuve, et que par conséquent l'étude de cette nappe souterraine s'impose à tout projet d'alimentation d'eau par cette voie.

Dx.

O. Heubner, Sur l'état des acides pendant la digestion gastrique chez les nourrissons. *Jahrbuch f. Kinderheilk.*, N. F., t. XXXII, p. 27.

Toutes les questions de digestion sont encore bien confuses. Elles s'éclaircissent un peu depuis qu'on ne fait plus de la digestion un phénomène purement physiologique, depuis qu'on admet que les diastases digestives peuvent n'être pas toujours les mêmes, provenir tantôt des sécrétions normales de l'organisme et tantôt de celles des microbes, depuis qu'on sait enfin qu'une même cellule ne produit pas toujours les mêmes diastases, et tient compte dans cette sécrétion de son mode d'alimentation.

Il faut dire pourtant que lorsqu'il s'agit de la digestion gastrique, quelques-unes de ces causes d'incertitude disparaissent. Les microbes n'y jouent d'ordinaire qu'un rôle assez effacé, et le rôle principal reste dévolu aux produits de sécrétion des glandes gastriques. On est donc conduit à penser que si on ajoute à ces causes de constance la constance dans le mode d'alimentation, si par exemple on ne nourrit que de lait les estomacs en expérience, si, pour plus de sûreté, on prend des estomacs

jeunes de nourrissons, on aura réuni les meilleures conditions possibles d'étude de ce mode de nutrition.

Il en serait peut-être ainsi si le problème se posait en effet sous cette forme : étudier d'une façon régulière la digestion d'un enfant en bonne santé, nourri au sein ou au biberon, mais digérant bien, et croissant d'une façon normale. Une étude un peu longuement suivie dans cette direction ferait sûrement disparaître bien des incertitudes et des préjugés au sujet de certains modes d'alimentation; mais elle n'est pas faite, et même toutes les recherches publiées sur ce sujet se présentent autrement. Ce sont en général des recherches faites dans les hôpitaux, sur des enfants qui n'y sont que parce qu'ils souffrent, soit d'une mauvaise alimentation antérieure et d'une déviation des fonctions de l'estomac, soit d'autres maladies étrangères en apparence au canal digestif, mais dont la répercussion sur lui reste toujours possible et peut toujours être suspectée. Ceux sur lesquels M. Heubner a fait porter son étude étaient dans ce cas. Il a seulement pris la précaution de n'opérer que sur des nourrissons en voie de croissance régulière, et dont le fonctionnement gastrique était normal, ou à peu près normal.

Il ne reste plus alors qu'à instituer une bonne méthode de recherches, mais de ce côté-là encore il y a des difficultés. L'usage de la sonde stomacale permet de prélever à volonté des échantillons du contenu de l'organe; mais on ne sait comment faire d'une façon précise l'analyse de ce contenu. Ce n'est pas que les méthodes manquent. Il y en a beaucoup; il y en a même beaucoup trop, car l'abondance des méthodes témoigne d'ordinaire qu'il n'y en a aucune de bonne. Nous avons déjà discuté dans ces *Annales* (t. III, p. 183) quelques-uns des procédés de dosage des acides libres dans le suc gastrique. Nous ne reviendrons pas sur ce sujet. Nous nous bornerons à indiquer quelques-unes des incertitudes de celui qu'a employé M. Heubner, non pas, est-il besoin de le dire, pour le vain plaisir de faire une critique, mais pour bien marquer le degré de créance à accorder aux résultats. Tout le monde est intéressé, même l'auteur lui-même, à bien distinguer ce qui est démontré de ce qui est seulement rendu probable, ce dont il ne faut plus douter et ce qui reste encore sujet de recherche et d'investigation nouvelle.

La méthode de Heubner se rapproche de celle qu'ont proposée MM. Cahn et Mering. On commence par distiller le liquide stomacal filtré de façon à en séparer les acides volatils. Nous noterons à ce propos qu'une distillation ne suffit pas, surtout faite dans les proportions des 4/5, comme l'indiquent Cahn et Mering. Il faut de toute nécessité rajouter au moins une fois de l'eau dans la cornue et recommencer une distillation nouvelle pour avoir la presque totalité des acides volatils. Il faut même au moins trois distillations quand on a affaire à l'acide acétique.

La chose a de l'importance pour la suite de l'opération, car on traite par l'éther le résidu de la distillation, pour y dissoudre l'acide lactique, et on traduit en effet en acide lactique la quantité d'eau de chaux nécessaire pour la saturation du résidu obtenu par l'évaporation de l'éther. Cette traduction est inexacte si la distillation a laissé des acides volatils que l'éther dissout. Mais, alors même que la distillation aurait tout enlevé, il est encore imprudent de croire que l'acide dissous par l'éther est uniquement de l'acide lactique. Il est vrai que l'acide lactique est la forme de transformation la plus habituelle du sucre de lait, mais il peut y en avoir d'autres, solubles aussi dans l'éther. Il me semble donc indispensable d'ajouter aux épreuves d'analyse la formation du lactate de zinc, facile à reconnaître au microscope.

Toutefois, les éléments que nous venons d'apprendre à déterminer sont secondaires dans une certaine mesure. On a le droit de les attribuer les uns et les autres à des fermentations anormales, survenues dans l'estomac, dont le contenu, surtout chez les nourrissons, est rarement acide, et où les ferments de la caséine et du sucre de lait peuvent se donner carrière. En fait, M. Heubner a constaté les faits suivants.

En ce qui regarde les acides volatils, sur 23 estimations quantitatives faites sur des enfants de 9 semaines à 11 mois, on n'en a trouvé que 5 fois des quantités dosables, et toujours chez des enfants nourris au biberon avec du lait de vache. Les proportions étaient du reste très faibles, car elles n'ont pas dépassé $0^{gr},19$ par litre, l'évaluation étant faite en acide acétique.

En ce qui concerne l'acide lactique, on en a fait 24 dosages sur lesquels 14 seulement en ont donné des quantités mesurables, oscillant entre $0^{gr},11$ et $0^{gr},40$ par litre. Ni pour lui, ni pour les acides volatils, M. Heubner n'a remarqué d'augmentation régulière avec la durée de la digestion, et quand on songe au degré de peuplement du lait lorsqu'il arrive dans l'estomac, aux bonnes conditions de température qu'il y trouve, on incline à penser que ni acide lactique ni acides volatils ne sont le produit d'une digestion physiologique.

Il en est tout autrement de l'acide chlorhydrique dont Leo et Van Puteren ont relevé la présence dans la digestion du lait. Cet acide ne peut provenir que d'une sécrétion. Sa quantité augmente avec la durée de la digestion, et Leo a même observé qu'à l'origine, il n'apparaît pas à l'état d'acide fixe, mais à l'état de combinaison avec la matière du lait.

Le caractère singulier de cette combinaison nous ramène à l'étude des moyens employés pour constater son existence. Lorsqu'on acidule de l'eau distillée avec un dix millième de son poids d'acide chlorhydrique, ce liquide devient capable de donner une réaction avec le rouge

de congo. Quand on a d'abord mélangé à l'eau distillée 1/6 de son volume d'une bouillie de caséine pure, ne rougissant plus le papier de tournesol, il faut que ce mélange contienne un millième d'acide chlorhydrique, c'est-à-dire dix fois plus que le précédent, pour donner à nouveau la même réaction. Voilà les deux faits qu'a relevés l'expérience. En les rangeant dans l'ordre que je viens de leur donner, la seule conclusion à en tirer, est que la caséine retarde la réaction colorante, et c'est là une notion qui est pour ainsi dire d'ordre général, car on la retrouve avec une foule d'autres matières colorantes dont les changements de teinte dépendent des matériaux présents dans la liqueur. Une réaction colorée témoigne de la formation d'un système d'équilibre nouveau, entre tous les corps contenus dans le milieu où elle se produit. Même avec la classique teinture de tournesol, le virage au bleu sous l'action des alcalis, ou au rouge sous l'action des acides, dépend de circonstances extérieures à la matière colorante et à l'acide ou à la base qu'on fait intervenir. Avec le congo, l'influence de la caséine est sensible, voilà tout ce qu'on peut dire ; mais quant à conclure que le fait est dû à ce que l'acide chlorhydrique contracte avec la caséine une combinaison instable, qui l'empêche d'agir sur le rouge de congo, je ne vois pas bien ce qui en donne le droit.

Je vois bien en revanche comment cette idée s'est introduite. On s'est dit : l'acide chlorhydrique dans l'eau distillée peut être dit *libre*, et alors nous pouvons dire aussi : l'acide chlorhydrique libre donne la réaction du *congo :* ou bien, le congo est un réactif de l'acide chlorhydrique libre. Or, il ne donne rien quand il y a peu d'acide et de la caséine. Donc, en présence de la caséine, les premières portions d'acide sécrétées ne sont pas libres, elles sont *latentes* ou *combinées*. J'aimerais mieux dire : le congo n'est pas un réactif sensible en présence de la caséine.

Et voici l'avantage de cette bonhomie dans l'interprétation. Quand on prend pour guide non plus la teinture de congo, mais celle de tournesol, rien n'est plus simple ni plus uni que l'histoire de la sécrétion de l'acide chlorhydrique dans la digestion stomacale des nourrissons. Les quantités de solution alcaline nécessaires pour ramener à la neutralité au tournesol le résidu de la distillation, épuisé par l'éther, sont très faibles au début de la digestion, vont en croissant ensuite, comme l'avaient vu Leo et Van Puteren, et peuvent atteindre des valeurs comparables à celles qu'on trouve chez les adultes. Nous sommes donc là sans doute en présence d'une sécrétion régulière, continue, graduellement croissante avec le temps : quand on prend pour guide le congo, cette conception si simple disparaît. Les premières portions d'acide chlorhydrique sécrété ne sont pas mises en liberté. On ne les trouve à l'état libre que « lorsque le pouvoir d'adhésion

(*bindende Kraft*) du contenu de l'estomac est épuisé », parce que c'est seulement à ce moment que le congo donne quelque chose.

D'après les recherches du Dr Muller, faites sous la direction d'Heubner, c'est seulement là où il y a 0,940 p. 1,000 d'acide chlorhydrique, dans le liquide stomacal que le congo donne sa réaction. Mais, si notre interprétation est exacte, cette limite serait évidemment différente avec une autre réaction que celle du congo. L'expérience est d'accord avec cette conclusion, et Van Puteren a trouvé en effet une limite inférieure, 0,694 p. 1000, en se servant comme réaction de celle du violet de méthyle ou de celle de la quinine. Avec la teinture de tournesol, la limite tombe tellement bas, qu'elle en est presque inappréciable. Nul doute pourtant qu'on ne la trouve en cherchant, mais en tout état de chose il semble qu'il vaut mieux prendre cette teinture pour guide qu'aucune des autres.

Il est vrai que la teinture de tournesol a l'inconvénient de traduire la présence de tous les acides, tandis que le congo, le violet de méthyle ont la prétention de n'être sensibles qu'à l'acide chlorhydrique libre, et c'est ce qui fait le secret de leur supériorité dans l'esprit de ceux qui s'occupent de chimie physiologique. Mais cette prétention est des plus discutables. Jusqu'ici toutes les réactions connues d'un acide sur une matière colorante sont à la fois fonction de sa nature et de sa quantité. Avec la teinture de tournesol, tel acide qui ne donne, quand il est en quantité très faible, qu'un virage insensible ou une teinte rouge vineux, donne le rose pelure d'oignon, quand on force la dose. Il serait étonnant qu'il en fût autrement avec les réactions colorantes moins connues, telles que celles du congo ou des sels d'aniline. En tout cas, si elles sortent de la loi commune, c'est à elles de faire leurs preuves sous ce rapport, et de démontrer qu'on n'a pas le droit de leur étendre la règle générale.

Il faut accompagner des mêmes réserves l'application d'une autre méthode employée par A. Hoffmann, le collaborateur de Heubner, pour doser l'acide chlorhydrique libre, et le distinguer de l'acide combiné à des bases faibles. M. Hoffmann juge de la quantité de cet acide libre par la quantité de sucre interverti, en opérant toujours pendant le même temps et à la même température. L'interversion du sucre par les acides est un phénomène trop complexe et encore trop mal connu, pour qu'on puisse y chercher un moyen de mesure. La seule chose qu'on sache vraiment sur lui, c'est que la quantité de sucre intervertie n'est ni proportionnelle à la quantité d'acide présente, ni au temps du contact, ni à la température. Il est possible, mais il n'est pas facile de faire sortir la régularité de tant d'irrégularités, et c'est seulement quand on ne peut pas faire autrement qu'on prend des mètres en caoutchouc pour mesurer des longueurs. Dx.

INSTITUT PASTEUR.

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MARS 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	1	1	»	2	7	»	»	1
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	»	»	»	5		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	5	»	»	1	»	»
Morsures aux mains { simples	»	6	10	»	16	42	»	4	12
Morsures aux mains { multiples	»	4			26		»	8	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	4	»	»	21	»	»	5	»	»
Pas de cautérisation	6	»	»	19	»	»	6	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	3	6	»	9	25	»	3	14
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	3		»	16		»	11	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	6	»	»
— *inefficaces*	4	»	»	11	»	»	6	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	12	»	»	2	»	»
Habits déchirés	5	»	»	23	»	»	13	»	»
Morsures à nu	1	»	»	2	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	9	9			
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	4	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	3	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	6	»	»	»	»	»
Morsures à nu	1	»	»	9	»	»	»	»	»
Totaux. { Français et Algériens		16	18		70	83		17	27
Totaux. { Etrangers		2			13			10	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					128				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 121 fois; chats, trois fois; porc, deux fois; vaches, une fois. Dans un cas, la blessure a été faite par un homme atteint de rage.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. MAI 1891. N° 5

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR UN BACILLE
TROUVÉ DANS UN CAS DE SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE
PRÉSENTANT CERTAINS CARACTÈRES
DU
TYPHUS EXANTHÉMATIQUE

Par V. BABES ET V. OPRESCU.

Avec la planche VII.

(Travail de l'Institut de pathologie et de bactériologie de Bucharest.)

Les descriptions du typhus exanthématique et des lésions qu'on y rencontre donnent l'impression qu'il ne s'agit pas d'une maladie reconnaissant toujours la même étiologie.

Le typhus exanthématique revêt en effet des formes cliniques variables, épidémiques, endémiques ou sporadiques. Si l'on peut le distinguer facilement de la fièvre typhoïde, sa distinction d'avec les septicémies hémorragiques est très difficile ; on n'y parvient qu'en tenant compte de l'absence de lésions externes antérieures, et de l'épidémicité et de la contagiosité du typhus. Mais si ces données font défaut, comme dans l'observation qui fait l'objet de ce mémoire, il est difficile de se prononcer sur la nature de la maladie.

Le 20 septembre 1889 succombait dans le service de clinique médicale de M. le professeur Stoicescu à Bucharest, le nommé Gheorghe B., ouvrier typographe, âgé de 22 ans. L'histoire clinique du malade se résume en peu de mots, à raison de son court séjour à l'hôpital : état de prostration avec une légère tendance au coma, alternant parfois avec un délire calme ; tempéra-

ture fébrile s'élevant à 41° C; la peau desséchée était parsemée de petites taches ecchymotiques ressemblant à une éruption de purpura hémorragique. Il y avait en outre des troubles intestinaux traduits par des selles diarrhéiques. Dans les derniers jours de la vie apparurent, le long des veines superficielles des régions antérieures du thorax et de l'abdomen, des stries rougeâtres; en même temps la partie supérieure du corps était un peu gonflée et d'une couleur brunâtre sale, comme au commencement de la putréfaction.

A l'autopsie, faite 10 heures après la mort, on constata les lésions suivantes:

Le cadavre offrait une couleur sombre des téguments tout à fait particulière, que l'on ne pouvait pas attribuer à la putréfaction ordinaire, vu la basse température et le court intervalle écoulé depuis la mort. La peau de la région abdominale était parsemée de nombreuses taches ecchymotiques. Du côté de l'encéphale, on constatait une forte congestion et un œdème des méninges, avec infiltration d'un liquide un peu trouble, rougeâtre, dans les sillons; la substance corticale est d'un gris très foncé, la substance médullaire blanchâtre, plus molle, plus plastique qu'à l'état normal.

Les amygdales augmentées de volume, proéminentes, d'un gris verdâtre, renferment dans leurs cryptes une substance crémeuse putride. Le tissu connectif du cou est infiltré d'un liquide jaunâtre un peu gélatineux; cet œdème se prolonge aussi dans le tissu conjonctif du médiastin antérieur. Les poumons sont hyperémiés, denses, et montrent par places, autour des bronches, une infiltration sanguinolente. Le poumon droit est plus dur, plus résistant, pâle, sclérosé au sommet, avec de petites cavernes arrondies, remplies d'une substance ressemblant au mortier. Le péricarde viscéral est parsemé de petites taches ecchymotiques; la musculature du cœur est décolorée, flasque; les cavités du cœur renferment peu de sang liquide. La rate, augmentée de volume, mesure 22 centimètres de longueur et 15 centimètres de largeur; la capsule en est mince, tendue, la pulpe fragile, d'un rouge brunâtre très foncé; elle s'enlève facilement. Le foie et les reins sont augmentés de volume, flasques, pâles, grisâtres, la substance corticale du rein plus flasque, plus pâle, plus succulente qu'à l'état normal. Du côté du système digestif, on constate un œdème des parois et un catarrhe aigu de la muqueuse des intestins. La vessie renferme une urine trouble. L'examen microscopique révèle les lésions suivantes :

Dans le foie, les cellules sont granuleuses, souvent sans noyaux, et l'on voit des groupes de bacilles fins dans certains vaisseaux intra-lobulaires. Dans la rate, il y a beaucoup de grandes cellules, ayant un noyau fragmenté; le réseau lymphatique en est plus pâle, les lacunes dilatées.

Le rein présentait des lésions bien curieuses, en ce sens qu'en outre d'une dégénérescence trouble et un peu graisseuse, il y avait par places des embolies de microbes à l'intérieur de certains glomérules, dont les parois montraient un aspect que nous avons d'abord considéré comme l'expression d'un commencement de dégénérescence amyloïde. La paroi de certaines anses, surtout de celles occupées par des microbes, est devenue plus grosse, uniforme, luisante, se colorant très bien par les couleurs d'aniline, mais sans donner la réaction de la substance amyloïde. On ne trouvait point d'hémorragies dans le tissu de l'organe.

Comme le complexus symptomatique ne laissait aucun doute sur la nature infectieuse de la maladie, nous avons pratiqué l'examen bactériologique des organes.

Dans ce but, nous avons ensemencé avec les divers organes 20 tubes renfermant différentes substances nutritives; avec chaque organe, nous avons procédé d'après la méthode de la dilution progressive. Les substances employées ont été la gélose simple ou glycérinée, la gélatine, le bouillon, le sérum de bœuf et la pomme de terre. Les différents tubes ont été exposés, soit à la température du corps, soit à une température de 18 à 20° C. Nous avons ensemencé en même temps la surface et la profondeur des milieux nutritifs. Pour l'examen microscopique, nous avons fait, avec le suc des organes des préparations étalées sur des porte-objets, colorées, après dessication, avec le violet de méthyle B.

Comme tous les organes, dont nous avions fait des ensemencements, ont donné des colonies caractéristiques d'un même microbe à l'état de pureté, nous donnerons comme type la description des cultures obtenues avec le suc de la rate.

Cultures sur gélose. — Sur la gélose gélatinisée obliquement, maintenue à l'étuve chauffée à 37° C., on voit à la surface une mince bande le long de la strie, composée, à la partie supérieure, de colonies rondes, un peu saillantes, luisantes, d'un millimètre ou plus, blanchâtres et transparentes. A la partie inférieure, elles sont confluentes sous forme d'une couche plus blanchâtre, transparente aussi; au-dessous de la surface il y a des cristaux acidulés; dans le liquide de condensation il se produit un précipité d'un blanc brunâtre. Sur la gélose glycérinée, les colonies sont déjà très appréciables à l'œil nu au bout de 12 heures; le précipité y est plus abondant. Les cultures dégagent un peu d'odeur de putréfaction. Dans les cultures plus vieilles, on voit aussi une strie très prononcée dans la profondeur; les cristaux sont plus apparents; au-dessous de la surface, le précipité devient plus dense, d'un blanc grisâtre, crémeux.

Cultures sur gélatine. — Ces cultures ont été faites par piqûre. A la surface on remarque une pellicule assez élevée, irrégulière, lobulée, blanchâtre, assez transparente, ayant l'aspect de la paraffine; le long de la piqûre, on voit s'échelonner

des colonies d'un blanc jaunâtre, qui augmentent dans la profondeur, où elles ont pris l'aspect de sphérules d'un diamètre qui va jusqu'à 1 ou 2 millimètres; celles qui sont le plus éloignées de la surface deviennent d'un brun manifeste.

Au bout de 8 jours la culture présente l'aspect suivant : à la surface on remarque de grandes plaques confluentes, fort transparentes, limitées par une circonférence assez irrégulière, entourée par une dentelure plus élevée et crénelée. Le long de la piqûre on voit des globes, séparés les uns des autres, d'un diamètre variable, lenticulaires, d'un blanc brunâtre. Au bout de 2 mois, la colonie de la surface est devenue concentrique, plus transparente ; les colonies situées immédiatement au-dessous de la plaque sont devenues presque brunes ; dans la profondeur elles ont augmenté encore de volume. On remarque des cristaux au niveau de la colonie superficielle.

La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Cette dernière substance, additionnée de suc de pommes de terre, est un milieu encore plus favorable au développement du bacille. Les colonies assez nombreuses augmentent de volume d'autant plus qu'elles s'éloignent de la surface.

Le microbe est facultativement anaérobie.

Cultures sur pomme de terre. — Les colonies se font remarquer à la surface sous la forme d'une mince couche grisâtre, uniforme, très transparente, parfois d'un gris brunâtre, peu apparente; en bas, des colonies plus élevées forment un réseau brillant. Au fond du tube, le liquide renferme un précipité blanchâtre ou d'un jaune brunâtre, assez abondant. Au bout de quelques jours, la pomme de terre prend une nuance brune assez manifeste.

Sur le *sérum de bœuf* on voit apparaître des colonies convexes transparentes, d'un diamètre qui dépasse rarement 1 millimètre, avec des bords élevés.

Cultures dans le bouillon. — Le trouble est très apparent au bout de 10 heures; 24 heures après, il commence à se former au fond du tube un précipité blanchâtre plus abondant quand on ajoute du glucose; en vieillissant, le liquide devient jaunâtre et la surface se couvre d'une mince pellicule.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES.

Les cultures ont été examinées après dessiccation dans une goutte d'eau étendue sur un porte-objet, et après coloration avec le violet de méthyle B. On constate ainsi, dans les cultures sur gélose, des micro-organismes en forme de bâtonnets assez courts et comme coupés, mêlés à des formes un peu ovales ; ils ne sont pas uniformément imprégnés par la matière colorante ; à côté d'individus qui restent pâles, il y en a d'autres mieux colorés, possédant des extrémités plus foncées, parfois même pointues ; leur largeur est de 0,4 — 0,5 μ : souvent même ils se réunissent deux à deux pour former des diplo-bactéries. (Pl. VII, fig. 2).

Dans la gélatine, les formes ovales sont plus nombreuses, leur largeur est moindre, leur coloration un peu diffuse, à la périphérie surtout: du reste, on voit aussi des individus mieux colorés, ils paraissent souvent entourés par une capsule ; leur largeur est de 0,3 — 0,4 μ. (Pl. VII, fig. 3.) Souvent, surtout dans les cultures fraîches, les bacilles sont très courts et renflés à leurs deux extrémités en forme de 8 (fig. 4). L'ensemble est incolore, et c'est seulement au point de contact des renflements qu'on retrouve l'aspect bacillaire sous forme d'un peu de substance chromatique.

Sur les pommes de terre, on trouve des bacilles rectilignes, parallèles, renflés parfois à l'une de leurs extrémités : leur largeur est variable ; à côté de bâtonnets courts et un peu plus épais, il y en a d'autres plus longs et mieux colorés, disposés en groupes arrondis. Sur les préparations faites avec l'exsudat fibrineux de la cavité pleurale d'un lapin mort à la suite de l'infection due à ce microbe, les bâtonnets, avec des extrémités bien coupées, laissaient voir en leur milieu un espace clair bien prononcé. Nous n'avons d'ailleurs pas observé de sporulation.

Quand on examine à l'état frais une culture dans le bouillon, après coloration par une solution peu concentrée de violet de méthyle, les bacilles, souvent réunis deux à deux, paraissent toujours pleins, les formes ovales sont ici mêlées avec des formes carrées ou bacillaires et se colorent faiblement par la méthode de Gram.

Si les bacilles cultivés sur les différents milieux sont un peu variables de forme et de dimension, ils offrent un caractère constant dont on ne peut nier l'importance, c'est leur grande mobilité, qu'ils conservent même assez longtemps dans le bouillon. Les mouvements ressemblent à ceux du bacille de la fièvre typhoïde, qu'ils surpassent en énergie. Dans une culture dans le bouillon, âgée de 11 jours, on observe encore des mouvements assez énergiques.

Le degré de température favorable au développement oscille entre 18° et 37° C. ; dans le bouillon, le développement ne s'est pas arrêté à 46° C. ; à cette température même, le bouillon s'est troublé 8 heures après l'ensemencement. Cette température n'exerce aucune action sur la longueur du bacille, contrairement à ce qui s'observe chez le bacille de la fièvre typhoïde. Toutes ces cultures sont saprogènes. Sur la gélose additionnée de glucose, il développe beaucoup de gaz.

Le bacille pousse très bien dans le liquide de Petruschky ; la substance nutritive bleuit déjà au bout de 24 heures. Le bouillon préparé avec la chair d'un lapin mort à la suite de l'infection avec ce bacille est encore un bon milieu nutritif.

Les cultures dans le bouillon peptonisé ne nous ont pas donné la réaction de l'indol. La vitalité du bacille persiste longtemps dans les tubes de culture; elle se maintient plus longtemps sur la gélatine que sur la gélose. L'action d'une température de 85° suffit au bout de 3 quarts d'heure à détruire la vitalité du bacille. Sa résistance à la dessiccation est assez grande ; une goutte de culture sur bouillon, desséchée pendant 3 jours, renferme encore des bacilles vivants.

EFFETS PATHOGÈNES DU BACILLE.

Nos expériences ont été faites sur les souris, les lapins, les cobayes, les pigeons, la corneille et les chiens, en nous servant pour les inoculations de cultures sur gélose, gélatine, pommes de terre et bouillon ; ces dernières se sont montrées particulièrement virulentes pour les lapins.

I. Avec une culture sur gélose obtenue avec la rate humaine, on a inoculé, à l'aide de l'aiguille de platine, le huitième jour

après l'ensemencement, une souris à la base de la queue. L'animal succomba douze heures après, avec un œdème hémorragique assez étendu autour du lieu d'inoculation : le foie était pâle, la rate augmentée de volume, les reins et les poumons injectés; ces organes ont servi à faire de nouvelles cultures du même microbe.

II. Une autre souris a été inoculée de la même manière avec une culture sur gélatine obtenue avec le liquide du médiastin antérieur ; l'animal succomba au bout de quatre jours ; à l'autopsie, nous lui avons trouvé une rate qui avait presque le double de son volume normal ; la pulpe en est d'une couleur plus foncée, les autres organes sont hypérémiés. Les ensemencements faits nous ont donné des cultures caractéristiques du même bacille à l'état de pureté.

III. — Avec une culture sur gélose, âgée de 2 mois, obtenue avec la rate de cette dernière souris, on a inoculé une autre souris sous la peau ; l'animal succomba quatre jours après; par les cultures, nous avons constaté la présence du bacille dans le sang, les poumons, le foie, les reins, la rate et le liquide péritonéal.

IV. — Avec une colonie superficielle sur gélatine, ensemencée avec la rate de la souris précédente, on a inoculé sous la peau une autre souris. Comme nous voulions savoir s'il y avait des différences entre la virulence des colonies superficielles et de celles qui se sont développées dans la profondeur à l'abri de l'air, nous avons inoculé de la même manière une autre souris (V) avec une colonie prise dans la profondeur de la substance. Les deux animaux ont succombé presque en même temps; à leur autopsie, notre attention a été particulièrement attirée par la couleur foncée, noirâtre du foie et de la rate ; ce dernier organe est sensiblement augmenté de volume.

Après l'inoculation, la respiration de ces animaux est très fréquente, ils hérissent leurs poils et se ramassent presque en boule.

On voit donc que l'action locale du bacille consiste dans la production d'un œdème et d'hémorragies au voisinage du lieu d'inoculation, tandis que l'effet général consiste dans l'envahissement de tous les organes par le bacille, dans une septicémie avec hypertrophie de la rate et coloration foncée brunâtre

des organes internes. Les lésions sont donc essentiellement les mêmes que celles observées chez l'homme.

VI. — Avec une culture de 8 jours, obtenue avec la rate de l'homme, on a fait une émulsion que l'on a injectée dans le muscle pectoral d'un pigeon. Quatre jours après, l'animal succomba avec une tumeur du muscle et avec hypérémie des organes internes. Avec la tumeur, le sang du cœur et les autres organes, on a obtenu de nouveau le même micro-organisme à l'état de culture pure. Les inoculations faites plus tard avec des cultures dans le bouillon n'ont plus tué les pigeons; seulement, après cette inoculation, ils deviennent réellement malades ; ils hérissent leurs plumes et ne mangent presque rien pendant quelques jours.

VII. — Une corneille, à laquelle on a inoculé dans le péritoine un centimètre cube d'une culture dans le bouillon, succomba au bout de 8 jours. Dans les cultures faites avec le foie, on a constaté les colonies du même bacille.

VIII. — Un cobaye, inoculé dans le péritoine avec un centimètre cube d'une émulsion faite avec une culture récente sur gélose glycérinée, succomba 18 heures après ; à l'autopsie on lui trouva une rate très augmentée de volume; les intestins hypérémiés, le péritoine recouvert de fausses membranes fibrineuses. Les ensemencements faits avec le foie, la rate, les reins et le péritoine nous ont donné les mêmes cultures caractéristiques.

IX. — Un autre lapin a été inoculé sous la peau avec une culture, de troisième passage sur pomme de terre, obtenue avec l'amygdale humaine ; il succomba au bout de 2 jours, avec une péritonite et des ecchymoses péritonéales; la rate était augmentée de volume ; les autres organes congestionnés. Les ensemencements sur les différentes substances nutritives nous ont donné des cultures pures avec les reins, le sang du ventricule gauche, la rate, le foie, le péritoine.

Deux autres lapins ont reçu : l'un, dans une veine de l'oreille, 1/2 centimètre cube d'une émulsion faite avec une culture sur gélose provenant de la rate humaine; l'autre, sous la peau, 1 centimètre cube d'une émulsion faite avec une culture provenant du foie humain. Un chien a reçu, sous la peau, 5 centimètres cubes de cette même émulsion. Il a résisté. Les deux lapins ont succombé dans les mêmes conditions que les précédents. Ultérieurement nous avons constaté que ces animaux sont très

sensibles à l'action du bacille, quand on le cultive dans le bouillon peptonisé. Ces cultures sont, à l'état frais, d'une virulence telle, que l'injection d'une seule goutte dans la chambre antérieure de l'œil du lapin a déterminé la mort de l'animal au bout de 48 heures.

En vieillissant, les cultures perdent peu à peu leur virulence. Ainsi, tandis qu'avec une culture récente il suffit d'une quantité minime et d'un temps assez court pour tuer un lapin, avec les cultures plus vieilles il faut augmenter la dose et attendre plus longtemps. En général, après l'inoculation d'une culture récente, les lapins sont morts au bout de 2, 3 ou 4 jours ; avec les cultures plus vieilles, les animaux ont succombé au bout de 14 ou 15 jours; en renouvelant les cultures, on peut conserver la virulence pendant un an et demi au moins.

De tous les animaux d'expérience, le chien seul s'est montré réfractaire à l'infection. Nous avons essayé l'inoculation sous la peau, dans la chambre antérieure et dans la cavité pleurale; les animaux, après avoir montré de petits nodules inflammatoires au point d'inoculation, ont toujours surmonté l'infection.

RELATIONS DU MICROBE AVEC LES TISSUS

Lésions des organes d'un pigeon ayant succombé à l'infection par le bacille. — Dans le foie, les grands vaisseaux dilatés sont entourés de foyers embryonnaires ; le tissu interstitiel est hypérémié, les cellules du foie sont plus granuleuses et se colorent avec difficulté. En outre, on constate des foyers plus grands, irréguliers, intralobulaires, qui sont constitués de la manière suivante : A la périphérie, on voit des cellules hépatiques à l'état de prolifération, de même qu'une agglomération de leucocytes avec des noyaux qui deviennent, vers la limite du foyer, de plus en plus vésiculeux ; aux bords de ces foyers, tous les vaisseaux sanguins sont oblitérés par des caillots composés de bacilles courts, fins, ayant de 0,3 à 0,4 μ de largeur, parfois granuleux, en sorte qu'ils donnent l'impression de coccus. A son centre, le tissu du foyer est tout à fait incolore; çà et là on aperçoit encore le contour des vaisseaux dilatés, qui sont pourtant vides de sang. Dans quelques points seulement, on voit s'étendre, vers le milieu du foyer, un vaisseau ou un groupe de vaisseaux (Pl. VII, fig. 5).

Dans la tumeur du muscle pectoral, on peut poursuivre le développement des lésions musculaires et vasculaires, ainsi que la relation du microbe avec les éléments du tissu.

Tout d'abord on constate une dilatation très remarquable des vaisseaux, qui sont entourés d'une agglomération de leucocytes polynucléaires, avec gonflement vacuolaire de ces éléments; les muscles semblent peu modifiés; leur striation longitudinale paraît plus évidente, ils deviennent plutôt hyalins et se colorent mieux qu'à l'état normal; leurs noyaux se gonflent: dans ce stade, les microbes bien colorés se trouvent dans le tissu conjonctif qui paraît œdémateux, les bacilles y sont plus disséminés; parfois ils forment des filaments, qui renferment des points chromatiques.

Plus tard, on observe en même temps une diapédèse très remarquable avec gonflement des leucocytes, une prolifération des cellules fixes et spécialement des noyaux musculaires. Cet exsudat comprime les vaisseaux et les fibres musculaires qui deviennent fragmentées, hyalines, et se trouvent souvent en fragmentation transversale, d'où il résulte des disques irréguliers; les leucocytes perdent leurs limites précises; en outre, on rencontre des granulations chromatiques résultant de la destruction des leucocytes; les microbes sont en dégénérescence, pâles, raccourcis, fragmentés, disposés en petits groupes dans les espaces intercellulaires.

Chez les lapins, on constate dans les reins les lésions suivantes : l'épithélium rénal est plus pâle, jaunâtre, un peu tuméfié, renfermant parfois des substances hyalines; les glomérules sont plus riches en cellules, ils contiennent parfois aussi des leucocytes avec des noyaux fragmentés ; il existe aussi quelques cellules endothéliales, montrant des figures karyokinétiques. Dans quelques glomérules, une partie des anses, dont la paroi est un peu épaissie et uniforme, sont très dilatées par des bouchons formés de bacilles qui occupent souvent tout un segment du glomérule; au voisinage même de certains glomérules, il y a des tubes contournés, tapissés par un épithélium vacuolaire.

Dans le foie, on trouve les vaisseaux dilatés, les cellules plus pâles, les nucléoles seuls étant colorés; parfois on ne trouve plus d'éléments colorés dans ces cellules.

Chez les souris, nous avons trouvé les lésions suivantes :

La rate renferme peu de cellules et beaucoup de granulations; dans les petits vaisseaux il y a des bouchons de bacilles que l'on rencontre aussi dans le tissu de la rate, sans qu'ils soient bien limités, en sorte que l'on voit de grands territoires de la pulpe, renfermant de grands noyaux pâles, parsemés de bacilles caractéristiques.

Dans les reins, les glomérules montrent par places une dégénération hyaline des parois des anses glomérulaires ; mais une minime partie des glomérules contient des microbes.

Dans les organes d'une autre souris, nous avons trouvé des lésions assez caractéristiques. Ainsi, dans les reins, les tubes contournés sont dilatés, l'épithélium est rempli de vacuoles disposées en forme de couronne; les noyaux sont devenus assez rares pour que beaucoup de cellules en soient privées, les canalicules sont remplis d'une substance granuleuse qui se colore en *rose* avec la rubine de Löffler, de telle sorte que la périphérie reste blanche tandis que le centre est rouge. Les vaisseaux sont dilatés, remplis de sang, leurs parois sont devenues hyalines; à leur intérieur, on ne voit point de microbes. Les artères sont entourées d'une large zone de leucocytes.

La lésion la plus caractéristique est offerte dans les glomérules : ceux-ci sont augmentés de volume, la paroi des anses est épaissie, uniforme, hyaline, brillante, fortement colorée; la lumière en est de beaucoup rétrécie, à l'exception des parties où les anses sont remplies des bacilles caractéristiques. Le vaisseau afférent est souvent rempli de bacilles, en sorte qu'ici chaque glomérule contient de grandes masses de bacilles, qui s'y localisent presque uniquement (Pl. VII, fig. 1).

Dans la pulpe de la rate, les vaisseaux sont remplis de bacilles fins; en d'autres endroits, les microbes se répandent dans le tissu lacunaire. Par places, on voit autour des foyers une agglomération de cellules; les vaisseaux, d'un calibre un peu plus grand, sont souvent oblitérés par le pigment brun ou par une masse uniformément colorée et par des cellules plus grandes que les leucocytes; de plus la masse, uniforme, renferme souvent de petits groupes de bacilles. En général, la rate renferme plusieurs cellules très grandes avec un noyau hypertrophié, irrégulier, entouré par plus ou moins de protoplasme.

Il résulte de ces recherches que les animaux inoculés avec

ce bacille présentent, de même que l'homme, une fièvre notable, la tuméfaction de la rate, la généralisation du microbe dans les organes, sans foyers inflammatoires ou purulents visibles à l'œil nu, c'est-à-dire des lésions de la septicémie. Mais, en outre nous voyons, ici comme chez l'homme, une pigmentation des organes et aussi des lésions vasculaires particulières.

Le chimiste de notre Institut, M. le Dr A. Babes, a réussi à séparer des cultures dans du bouillon sans peptone deux espèces d'albuminoses : l'une qui est soluble dans l'eau, de couleur brun foncé, comme la poudre de café, l'autre soluble dans l'eau acidulée avec l'acide acétique; toutes les deux donnant la réaction du biuret. Bien qu'obtenues en très petites quantités, nous les avons employées pour faire des inoculations chez les lapins. Elles ont déterminé des effets pathogènes. L'albuminose brune a produit, même à très petite dose, des phénomènes toxiques, à la suite desquels l'animal est mort au bout de huit jours, après avoir présenté une réaction fébrile assez intense et un œdème hémorragique au point d'inoculation.

L'analyse de la précédente observation présente un bon exemple de ces cas de septicémie avec hémorragie, qui se développent spontanément, et qui diffèrent du typhus pétéchial par l'absence du caractère épidémique, par les symptômes de la maladie, par la coloration foncée de la peau et des organes internes, qui nous avaient fait soupçonner d'abord ici une origine palustre. Mais comme nous n'avons trouvé nulle part ni le pigment noir de la malaria, ni les parasites du sang, nous avons éliminé la malaria.

Différents auteurs ont entrepris des recherches bactériologiques sur le typhus exanthématique, mais avec des résultats peu satisfaisants. Ainsi Hlava (*Arch. Bohêmes de médec.*, août 1889) a trouvé dans plusieurs cas, dans les organes des individus ayant succombé au typhus exanthématique, un bacille très court, gros, formant des chaînettes. Il pousse sur la gélose sans caractères spéciaux, mais non sur gélatine à la température de la chambre; il détermine une élévation de la température et des taches rouges sur la peau des petits cochons, mais rien chez le lapin, le cobaye ou la souris. Il nous semble que les caractères de ce microbe ne témoignent pas en faveur de son rôle essentiel dans cette maladie.

Le microbe trouvé dans notre cas paraît, au contraire, jouer un rôle essentiel dans la production des symptômes morbides, et il nous explique les hémorragies par une dégénérescence spéciale des parois vasculaires. La couleur brune qui se développe dans les cultures du microbe et dans les organes des animaux qu'il ne tue pas trop vite, ainsi que l'intumescence de la rate, sont analogues à ce qu'on trouve chez l'homme. L'albuminose toxique, isolée des cultures, présente aussi cette couleur et produit des hémorragies. La fièvre élevée que l'on a observée chez l'homme et chez les animaux inoculés, de même que les propriétés saprogènes prononcées des cultures, nous expliquent la putréfaction avancée que l'on a observée à l'autopsie. Enfin, nous considérons comme un caractère important pour la valeur du microbe que nous venons de décrire, cette circonstance que nous l'avons trouvé peu de temps après la mort et exclusivement dans tous les organes examinés.

Il s'agit donc, dans notre cas, d'un bacille produisant une maladie ayant plusieurs des caractères du typhus exanthématique, mais avec certaines particularités qui en diffèrent; ce bacille présente un intérêt spécial à cause de ses propriétés biologiques, par lesquelles l'on peut s'expliquer les signes particuliers de la maladie.

Il est encore à remarquer que ce bacille a été trouvé aussi dans l'urine, les vaisseaux du rein n'étant pas déchirés, mais profondément altérés par une dégénérescence spéciale, à la suite de laquelle ils étaient incapables de mettre obstacle au passage du microbe.

Le fait est d'autant plus important, qu'il démontre qu'il existe certaines lésions bactériennes des vaisseaux ayant pour effet de les rendre plus perméables aux microbes, ce qui jusqu'à présent n'a pas été mis en évidence d'une manière certaine pour d'autres maladies infectieuses.

Nous avons eu encore une fois l'occasion d'observer à Bucharest un cas semblable, mais dont il nous a été impossible de poursuivre l'étude : il est donc permis d'admettre que le fait auquel nous avons eu affaire n'est pas un fait unique, et s'est présenté ou se représentera.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

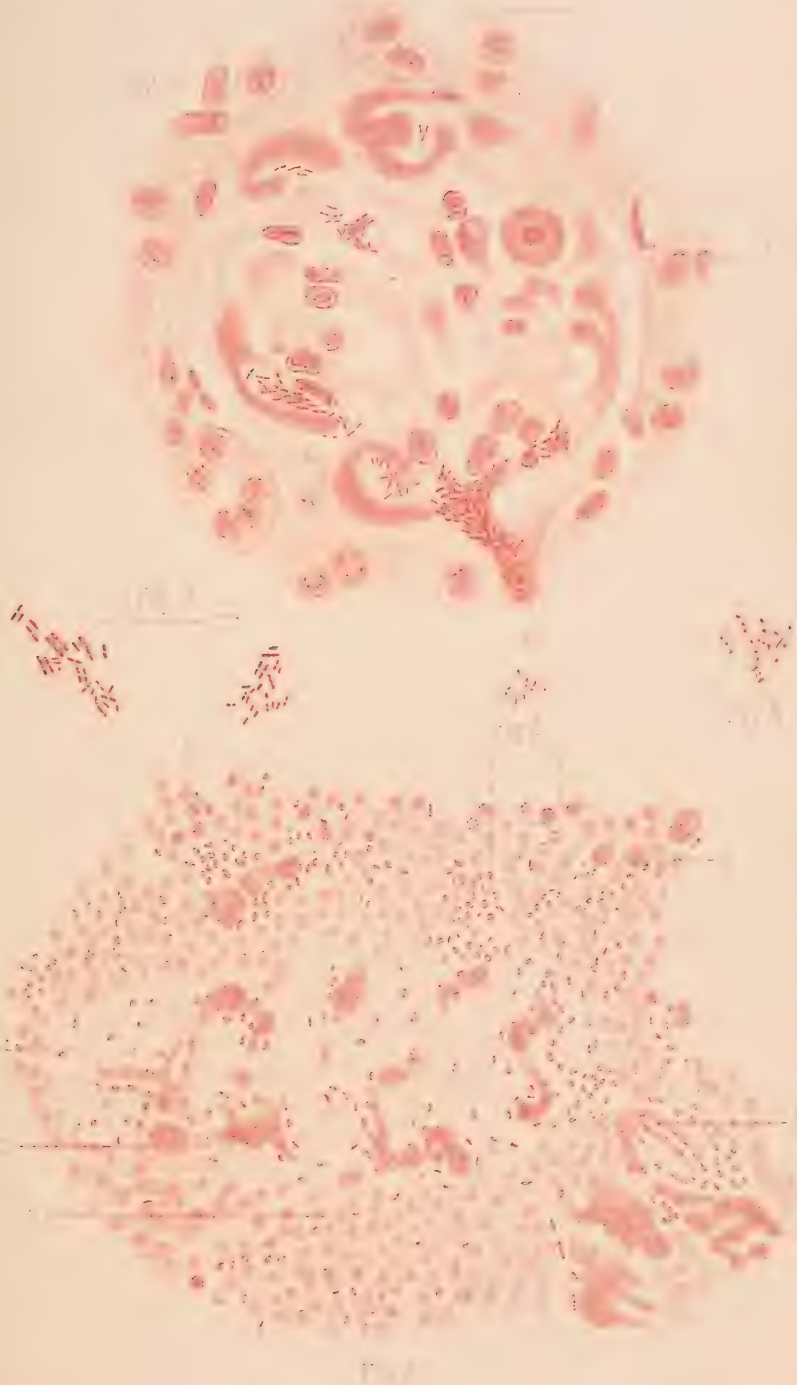
Pl. VII, Fig. 1. — Glomérule du rein d'une souris morte trois jours après l'inoculation (coloration avec le Rubin de Lœffler, gross. 1,000 diam. environ). — *B*. Capsule de Bowman; — *A*, artère afférente à paroi hyaline et remplie de microbes, ses anses hyalines contiennent des microbes; — *e*, vaisseau capillaire interstitiel; — *t*, canalicule urinaire; — *cy*, cylindre hyalin dans un canalicule.

Fig. 2, 3, 4. — Formes diverses de la bactérie.

Fig. 5. — Coupe du foie d'un pigeon mort après l'inoculation du microbe dans un muscle pectoral (coloration par le Rubin de Lœffler, gross. 200 diam. environ).

Dans ce lobule on voit une partie plus pâle (*r p*), dont une partie des vaisseaux est remplie de microbes. La paroi de ces vaisseaux est en partie plus large, plus uniforme et mieux colorée (*h*). De même quelques groupes de cellules hépatiques du voisinage sont devenues plus uniformes et se colorent mieux.

Le foyer modifié présente un aspect vacuolaire causé par les vaisseaux dilatés, tandis que le réseau des cellules hépatiques est devenu pâle et qu'on y distingue plus les contours des cellules. Autour du foyer mortifié, les cellules hépatiques, quoique pâles, sont reconnaissables, le protoplasma est envahi par des gouttelettes de graine X. Par place on y voit des capillaires intralobutaires dilatés et remplis de fragments cellulaires *v*. Un autre groupe de vaisseaux remplis de microbes (*z*) est entouré de tissu hépatique moins modifié. En *t*, on voit un tissu hépatique presque normal avec des noyaux en voie de prolifération.



Babes del. Karmanski lith. Imp. Lemercier & Cie Paris

SUR LES FERMENTATIONS

PRODUITES PAR

UN MICROBE ANAÉROBIE DE L'EAU

PAR M. L. PERDRIX.

En 1861, la notion de vie anaérobie a été introduite dans la science par les travaux de M. Pasteur sur le vibrion butyrique [1]; ce ferment a été le premier connu des êtres vivant sans oxygène libre.

Depuis cette époque, on a constaté que beaucoup d'autres microbes peuvent se développer sans air; mais, en général, leur physiologie intime n'a pas été étudiée. Il est cependant possible de le faire pour certains d'entre eux, ceux qui, par exemple, dégagent des gaz, comme le vibrion butyrique.

Si l'on constate, ainsi que l'a fait M. Pasteur, des variations dans la composition des mélanges gazeux, on peut penser avec lui [2] qu'elles correspondent à des changements dans les transformations chimiques qui se produisent.

J'ai étudié à ce point de vue un bacille constamment présent dans les eaux des conduites de Paris.

J'indiquerai d'abord comment on peut l'obtenir à l'état de pureté; j'exposerai ensuite sa morphologie et la nature des produits auxquels il donne naissance, lorsqu'il se développe aux dépens de différentes substances, telles que les sucres et la matière amylacée.

1. PASTEUR, Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre, et déterminant des fermentations (*Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, tome LII, page 344).

2. PASTEUR, *Études sur la bière*, chapitre VI, page 297.

I. — SÉPARATION ET PURIFICATION DU BACILLE

Un milieu nutritif stérilisé, ensemencé avec quelques gouttes d'eau des conduites de Paris[1], se peuple rapidement d'une foule de microbes divers, microcoques, bâtonnets, etc. Au bout de quelques jours, les aérobies ont absorbé tout l'oxygène du liquide et empêchent l'accès de l'air ; les anaérobies commencent alors à pulluler et à produire des fermentations, avec dégagement de gaz.

Pour obtenir le bacille cherché, je me sers de la pomme de terre comme milieu de culture, et je fais le vide dans les vases employés, afin d'éliminer dès l'origine les microbes uniquement aérobies.

Dans des tubes à essai ordinaires, mais à parois assez résistantes, j'introduis de petits morceaux de pommes de terre jusqu'à la hauteur de 2 à 3 centimètres, et j'ajoute une quantité d'eau suffisante pour les recouvrir. Après avoir fermé l'extrémité par un tampon de coton, je stérilise le tout à l'autoclave à 115°.

Lorsque ces tubes sont refroidis, j'y sème quelques gouttes d'eau des conduites de Paris, ou mieux un peu du dépôt laissé par ces eaux sur une bougie Chamberland ayant servi à la filtration pendant plusieurs jours. Chacun d'eux est ensuite étiré au chalumeau dans sa partie centrale ; après avoir enfoncé le coton et étiré une seconde fois au-dessus, je fais le vide avec la pompe à mercure. Je ferme ensuite à la lampe la partie étranglée et je place ces tubes à l'étuve.

Le lendemain de l'ensemencement, de nombreux microbes se sont déjà développés ; mais, si l'on attend quelques jours, on constate un fort dégagement de gaz, et la pression dans l'intérieur du tube devient considérable.

J'introduis par aspiration dans une effilure stérilisée quelques gouttes d'une culture de huit à dix jours environ, et je les maintiens ensuite pendant 10 minutes à 78°-80°. Le liquide ainsi chauffé est ensemencé dans des tubes à pommes de terre, où le bacille se développe à nouveau.

1. Les expériences ont été faites : 1° avec l'eau de Seine prise au laboratoire de l'Ecole normale supérieure; 2° avec l'eau de Vanne, prise aux robinets de l'Institut Pasteur, rue Dutot, 25.

Ce procédé élimine les microcoques et une partie des bacilles de l'eau ; mais il laisse dans les cultures toutes les spores qui résistent 10 minutes à la température de 80°.

Séparation des colonies. — Reste maintenant à obtenir des colonies séparées, provenant d'une seule cellule. Pour cela, j'emploie les tubes à cultures sur pommes de terre imaginés par M. Roux [1], qui peuvent être stérilisés d'une façon certaine à l'autoclave. Lorsqu'ils sont refroidis, je prends, avec un fil de platine stérilisé, une trace de la culture précédente, et je la sème en lignes sur une série de pommes de terre. Après avoir fait le vide dans les tubes, je les ferme à la lampe et les mets à l'étuve.

Colonies sur pommes de terre. — Au bout de quelques jours, si la quantité de semence n'a pas été trop considérable, on aperçoit sur les tranches de pommes de terre des taches séparées. Les colonies du bacille cherché sont d'abord un peu blanches ; elles s'élargissent en s'agrandissant circulairement et forment de petits mamelons, autour desquels le substratum est un peu creusé. En même temps, la pomme de terre paraît partiellement liquéfiée, et le liquide qui s'en écoule se rassemble à la partie inférieure.

Quand on ouvre les tubes de culture, il y a explosion, et, par suite de la diminution de pression, toutes les colonies abandonnent le gaz qu'elles renferment : sur chacune d'elles, il se forme de petits cratères laissant échapper des bulles.

Si l'on a le soin de choisir un tube contenant une ou deux colonies et de prendre dans l'une d'elles une trace de semence, on est à peu près sûr d'obtenir une masse de microbes provenant originairement d'un bacille unique.

La certitude n'est pas complète ; car il pourrait se faire que la colonie fût due à un paquet formé de plusieurs germes agglutinés. Pour être certain de la pureté, il est prudent de faire une séparation nouvelle, en se servant d'un milieu de culture moins favorable que la pomme de terre.

Colonies dans la gélatine. — La gélatine nutritive ordinaire réalise cette condition ; même en employant beaucoup de semence, il ne s'y développe jamais que peu de colonies.

Avec une petite quantité de substance empruntée à une colo-

1. E. Roux, *Annales de l'Institut Pasteur*, tome II, 1888, page 28.

nie sur pomme de terre, j'ensemence un tube en profondeur, et, quand le développement est commencé, j'introduis une goutte de cette nouvelle culture dans quelques centimètres cubes d'eau stérilisée.

On ne peut songer à opérer à l'aide de plaques, le bacille cherché étant anaérobie. J'ai employé le procédé suivant :

Un tube de gélatine est liquéfié par la chaleur ; il est maintenu dans un bain-marie à la température de 30 à 35°, et ensemencé avec quelques gouttes de la dilution précédente.

J'y fais passer avec pureté un courant d'hydrogène pendant deux à trois heures environ, afin d'enlever par diffusion l'air contenu dans le milieu gélatiné.

J'emploie alors des tubes de verre effilés, fermés par un tampon de coton ; ils ne diffèrent de ceux qui servent ordinairement dans les laboratoires que par l'effilure, dont la longueur est de 15 centimètres et le diamètre d'un millimètre environ.

Par aspiration, et sans arrêter le courant d'hydrogène, je les remplis de gélatine ensemencée, et je les ferme aussitôt à la lampe à l'extrémité inférieure et à la partie supérieure, de façon à emprisonner complètement le milieu nutritif.

Ces tubes sont maintenus verticalement pendant quelques instants, afin de permettre aux petites bulles d'hydrogène qu'ils contiennent de se rassembler à la partie supérieure. Puis, quand la masse est devenue bien homogène, je les place horizontalement et je laisse la solidification s'effectuer.

Ce procédé simple et rapide peut servir à la séparation des microbes anaérobies qui donnent des colonies dans la gélatine. Il se rapproche beaucoup de ceux qui ont été indiqués par M. Salomonsen[1] et par M. Vignal[2].

Au bout de cinq à six jours, on aperçoit, en certains points des tubes effilés, de petites taches blanches, distinctes, donnant lieu à un dégagement de gaz : autour de chacune d'elles apparaissent des bulles qui disloquent la masse sans la liquéfier.

J'ai toujours choisi les tubes qui ne renfermaient qu'une colonie pour prendre la semence pure de mon bacille, que j'appellerai *bacille amylozyme*, à cause de la propriété qu'il possède de faire fermenter l'amidon.

1. J. Salomonsen, *Technique élémentaire de bactériologie.*
2. W. Vignal, *Annales de l'Institut Pasteur*, tome I, 1887, page 358.

II. — MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE DU BACILLE AMYLOZYME.

Le bacille amylozyme, sur la pomme de terre et dans les milieux ordinaires de culture, est mobile, et a environ 2 à 3 μ de longueur et $0\mu,5$ de largeur : il est arrondi à ses extrémités. Il se réunit par couples ou par chaînes, dont les mouvements sont d'autant plus lents qu'elles sont plus longues.

Cette mobilité est diminuée et même arrêtée complètement par la présence de l'oxygène de l'air, comme pour le vibrion butyrique de M. Pasteur.

Ce bâtonnet se colore facilement, mais il n'est pas nécessaire de le colorer pour y voir les spores, qui ont leurs caractères ordinaires, et finissent par se mettre en liberté. par résorption du filament qui les contenait.

Physiologie générale. — L'amylozyme, dans aucun milieu, même dans ceux qui lui conviennent le mieux, ne peut pousser à l'air ; dans le vide, au contraire, il est facile d'obtenir un développement ; il en est de même dans l'hydrogène, l'azote ou l'acide carbonique : je n'ai jamais constaté que la présence ou la nature du gaz ait une influence quelconque sur la vie du bacille.

Bien qu'il soit anaérobie, il est possible de le faire pousser à l'air en ensemençant, dans la profondeur du liquide sur lequel on opère, une quantité notable de culture fraîche ; les gaz dégagés forment une atmosphère dépourvue d'oxygène, et la fermentation devient bientôt générale.

On peut encore la faciliter, si l'on veut employer de grandes quantités de substance, en mettant une mince couche d'huile dans le ballon, et stérilisant le tout ensemble à l'autoclave.

Conditions de température. — La température la plus favorable pour obtenir une culture rapide est de 35° environ.

De 20 à 25°, l'amylozyme pousse encore très bien ; seulement, la fermentation ne débute pas aussi tôt, et elle est plus lente.

Vers 16 ou 17°, il n'y a aucun développement le deuxième jour ; le troisième, quelques bulles de gaz apparaissent, et le quatrième, la fermentation est manifeste : elle s'arrête au bout d'une quinzaine de jours. En somme, pour qu'elle se produise

dans de bonnes conditions, la température ne doit pas être trop basse.

Elle ne doit pas non plus être trop élevée : des tubes placés à 50°, 45°, 44° n'ont pas poussé. A 42°-43°, il y a toujours fermentation.

Dans ces conditions limites, le bacille donne des spores comme à 35° : il se trouve cependant dans de mauvaises conditions de vie ; car, si l'on ensemence quelques gouttes de cette première culture dans de nouveaux tubes à la même température, ceux-ci restent généralement stériles. Mais la spore n'est pas tuée, car des tubes restés sans culture pendant dix jours à 50°, et remis ensuite à l'étuve à 35°, ont poussé aussi rapidement que d'autres nouvellement ensemencés.

Les spores résistent dix minutes à 80°. Cette propriété a d'ailleurs été employée, comme on l'a vu plus haut, pour le séparer partiellement des microbes de l'eau moins résistants que lui.

Durée de conservation des spores. — L'amylozyme garde très longtemps la faculté de se reproduire : des germes conservés pendant cinq à six mois dans une culture sur pommes de terre peuvent se développer à nouveau, bien qu'avec un peu de retard. Il serait difficile de dépasser ce terme avec les cultures ordinaires, qui sont toujours légèrement acides.

Dans un milieu neutre, au contraire, la durée de conservation est beaucoup plus considérable : j'ai trouvé des germes pouvant donner naissance à de nouvelles cultures au bout de dix-huit mois.

Milieux de culture. — Le bacille amylozyme se développe bien dans les liquides ordinairement employés en microbiologie, par exemple, dans le bouillon de veau acide ou neutralisé ; mais les cultures s'arrêtent assez rapidement : elles durent deux ou trois jours à 35°.

Il fait fermenter les sucres, agit énergiquement sur la matière amylacée, mais n'a pas d'action sur la cellulose et sur le lactate de chaux.

Ces propriétés le différencient de l'amylobacter de M. Van Tieghem et du vibrion butyrique de M. Pasteur.

Influence générale de l'acidité et de l'alcalinité. — Avant d'étudier les fermentations produites par l'amylozyme, j'insisterai encore

sur un point spécial de sa physiologie générale : sa sensibilité aux acides et aux alcalis.

Si l'on détermine la réaction des milieux dans lesquels il a poussé, on constate que, malgré la diversité des substances employées, on obtient un résultat constant : la culture s'arrête toujours quand l'acidité du liquide atteint un taux déterminé : $0^{gr},10$ à $0^{gr},12$ pour 100^{cc} (évalué en acide sulfurique).

Or, je montrerai plus loin que ce bacille transforme en acides les sucres et l'amidon : on ne pourra donc avoir de fermentation complète qu'en empêchant cette acidité limite d'exister. Il suffira pour cela d'ajouter du carbonate de chaux dans les vases, de façon à neutraliser à chaque instant les acides formés.

Par comparaison, j'ai déterminé quelle était l'acidité nécessaire pour empêcher le commencement du développement de l'amylozyme sur la pomme de terre.

Plusieurs séries d'expériences m'ont donné le même résultat : toutes les fois que l'acide sulfurique ne dépassait pas $0^{gr},055$ pour 100^{cc}, le bacille s'est développé. Au delà de cette limite, je n'ai jamais obtenu de culture.

Ce chiffre 0,055 est notablement inférieur à 0,11, qui correspond aux cultures terminées. Nous retrouvons ainsi un fait d'ordre général, souvent constaté pour les antiseptiques : l'acidité qui peut empêcher un commencement de développement est impuissante à arrêter une fermentation en activité.

Les milieux trop alcalins ne conviennent pas non plus à l'amylozyme : il ne se développe pas quand la dose initiale de potasse atteint $0^{gr},08$ 0/0.

Dans ces liqueurs alcalines, l'acide formé ne tarde pas à saturer la potasse; la culture s'arrête encore quand l'acidité atteint la limite ci-dessus indiquée : $0^{gr},11$ 0/0.

III. — FERMENTATION DES SUCRES.

Je ne me suis occupé jusqu'ici que des conditions de la vie du bacille amylozyme et des milieux qui lui conviennent.

J'étudierai maintenant les transformations chimiques auxquelles il donne naissance, en commençant par les sucres, mieux définis chimiquement et d'une composition moins complexe que la pomme de terre.

Dégagement de gaz. — D'une façon générale, la fermentation des sucres donne lieu à un dégagement considérable de gaz. Le mélange gazeux ainsi obtenu est constamment formé : d'acide carbonique, absorbable par la potasse; et d'hydrogène, complètement transformé en vapeur d'eau, quand on le chauffe dans une cloche courbe avec du chromate de plomb.

Mais, comme dans les expériences de M. Pasteur sur la fermentation butyrique, si la nature des gaz dégagés reste constante, il n'en est pas de même de la proportion dans laquelle ils entrent dans le mélange : celle-ci varie avec les différents sucres qui servent d'aliment au microbe, et, pour le même milieu, avec l'âge de la culture.

En même temps, les sucres sont transformés en acides butyrique et acétique; et ce mélange est variable également aux différents moments du développement du bacille.

Y a-t-il une relation entre la composition des gaz dégagés et celle des acides formés? Que donne l'étude comparative des variations de ces mélanges (gaz et acides)?

Les cultures étant faites avec addition de carbonate de chaux, il est prudent, si l'on opère en vases clos, d'employer de grands ballons ne contenant que peu de liquide, afin d'éviter les explosions. Ceux qui m'ont servi, d'une capacité de 300^{cc} environ, ne renfermaient jamais plus de 50^{cc} de liquide; quelques-uns cependant ont éclaté par suite de la pression des gaz dégagés.

Mode opératoire. — Pour opérer sur de plus grandes quantités de sucre, et surtout pour suivre les fermentations de jour en jour, en recueillant à chaque instant les gaz formés, j'ai employé le dispositif suivant :

Je prends un ballon à fond plat de 1 litre 1/2, fermé par un bouchon à deux trous. Le premier laisse passer un tube recourbé horizontalement et descendant jusqu'à la partie inférieure du vase; il renferme un tampon de coton. L'autre contient un tube court, traversant simplement le bouchon, et contenant également un peu de coton.

J'y introduis environ 3/4 de litre de bouillon sucré, avec un peu de carbonate de chaux pulvérulent : je stérilise le tout à l'autoclave à 115° pendant 10 minutes et je laisse refroidir.

Mais une masse aussi considérable conserve longtemps sa température ; et, si la pression diminue trop rapidement, surtout

en présence du carbonate de chaux pulvérulent, le liquide peut bouillir à nouveau avec soubresauts et faire sauter le bouchon.

Il est facile d'éviter cet accident en comprimant un peu d'air dans l'autoclave, à mesure que la température baisse, de façon à le laisser refroidir sous pression.

Pour ensemencer ce ballon, j'enlève le coton du petit tube, et j'y introduis, avec les précautions ordinaires, une goutte d'une culture jeune. Je remets le coton, et, à l'aide d'un caoutchouc bien serré, j'adapte un tube de dégagement ordinaire, destiné à recueillir les gaz sur le mercure.

Par le tube recourbé, je fais passer ensuite un courant lent mais prolongé d'azote, pour enlever par diffusion l'air du ballon et du liquide de culture.

On le met alors à l'étuve avec la cuvette de mercure; pendant deux à trois heures, il se dégage des bulles provenant de la dilatation du gaz du ballon. Mais l'équilibre s'établit et l'on abandonne l'appareil à lui-même.

Il est important, pour obtenir des résultats bien comparables, d'opérer avec des cellules provenant d'une colonie unique; mais de plus, suivant l'âge des semences employées, on peut avoir des différences très marquées dans le commencement du développement. Quand je faisais des expériences comparatives, la semence était préparée de la façon suivante: une trace d'une colonie sur gélatine était introduite dans un tube à pommes de terre. J'y faisais le vide : le lendemain, il était en pleine fermentation. J'ensemençais alors dans chacun des grands ballons une goutte de cette première culture; en les mettant à l'étuve en même temps, j'obtenais des fermentations donnant aux mêmes moments des gaz semblables en quantité et en qualité.

Je vais exposer avec détails les résultats que j'ai obtenus par la culture de l'amylozyme sur le glucose.

Fermentation du glucose. — Quatre ballons contenant chacun 850^{cc} de bouillon de veau, additionné de glucose ($1^{gr},95$ pour 100^{cc}), et 10 grammes de carbonate de chaux pulvérulent, sont mis en fermentation par le procédé ci-dessus indiqué.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, il y a dans tous un commencement de culture qui se manifeste par une mousse légère, en certains points de la surface libre.

Voici les proportions des gaz correspondant aux deux derniers ballons pour lesquels la marche de la fermentation a été la même :

	VOLUMES DES GAZ DÉGAGÉS.		RAPPORTS $\frac{H}{CO^2}$.	ACIDE CARBONIQUE provenant de la décomposition du carbonate de chaux.
	Hydrogène.	Acide carbonique.		
36 heures après l'ensemencement	1.200cc	510cc	70/30	120cc
48 heures après l'ensemencement.....	2.640cc	1.480cc	64/36	365cc
3 jours après l'ensemencement	3.650cc	2.410cc	60/40	625cc
9 jours après l'ensemencement (fermentation achevée).....	5.340cc	4.080cc	56/44	1.010cc

Ce tableau montre que le rapport de l'hydrogène à l'acide carbonique va constamment en diminuant : au commencement, il est de 7/3 ; à la fin de l'expérience, les volumes des gaz dégagés sont sensiblement égaux.

Si l'on détermine en même temps les acides contenus dans les cultures depuis le premier essai jusqu'à la fin de la fermentation, on constate que la proportion d'acide butyrique va constamment en augmentant. Ce résultat s'explique : *a priori*, il doit y avoir d'autant plus d'acide carbonique mis en liberté que l'acide moins oxydé se produit plus abondamment.

Mais, il est utile de préciser les faits et de voir si, à l'aide des chiffres donnés par l'expérience, on peut obtenir une formule rationnelle représentant la transformation effectuée.

Détermination de la formule de la fermentation. — Examinons le ballon dans lequel la fermentation a été complète : il contenait, à l'origine, 16gr,6 de glucose.

Le neuvième jour, le dégagement de gaz étant complètement arrêté depuis 48 heures, la culture est filtrée.

Le liquide est un peu acide : pour arriver à la neutralisation, il faut ajouter 75cc d'eau de chaux. Tout est maintenant à

l'état de sel de chaux, on constate qu'il ne reste plus de sucre, qu'il n'y a pas d'alcool, et que la quantité de chaux tenue en solution correspond à $5^{gr},086$ d'acide sulfurique.

Cette acidité correspond à $1^{l}.175$ d'acide carbonique dégagé.

Mais, si l'on tient compte des 75^{cc} d'eau de chaux à ajouter pour neutraliser les acides libres, il reste seulement $1^{l},010$ pour l'acide carbonique extrait du carbonate de chaux.

Le liquide précédent est concentré par distillation dans le vide, et le résidu évaporé dans un dessiccateur à acide sulfurique. On met en suspension dans l'éther une partie de la poudre obtenue, et on ajoute ce qu'il faut d'acide sulfurique pour mettre l'acide en liberté, on épuise par l'éther, qu'on sature par la chaux et qu'on distille. On obtient ainsi le sel de chaux pur.

Composition des acides. — Pour en faire l'analyse, j'emploie la méthode donnée par M. Duclaux [1] pour la détermination des acides gras volatils.

J'en dissous 2 à 3 grammes dans 100^{cc} d'eau, et j'y ajoute un peu d'acide sulfurique. Ce mélange, étendu à 110^{cc}, est distillé, et les portions condensées fractionnées en dix prises successives de 10^{cc} chacune, dont on détermine l'acidité avec de l'eau de chaux.

Les résultats moyens de trois expériences sont inscrits dans le tableau suivant :

	ACIDITÉS à l'eau DE CHAUX	SOMMES PARTIELLES	α	A	$\frac{b}{a}$
1	20,3	20,3	15,2	15,2	3,2
2	17,8	38,1	13,4	28,6	2,68
3	16,2	54,3	12,2	40,8	2,60
4	15,1	69,4	11,3	52,1	2,54
5	13,6	83,0	10,3	62,4	2,62
6	12,1	95,1	9,1	71,5	2,62
7	10,8	105,9	8,1	79,6	2,71
8	9,7	115,6	7,3	86,9	2,67
9	8,8	124,4	6,6	93,5	2,6
10	8,6	133,0	6,5	100,0	»

1. Duclaux, Sur les forces élastiques des vapeurs émises par les mélanges de deux liquides. *Annales de chimie et physique*, 5e série, t. XIV, 1878.
Duclaux, Sur un nouveau moyen d'éprouver la pureté des corps volatils. *Annales de chimie et physique*, 6e série, t. VIII, page 542.

Pour comparer ces chiffres à ceux donnés par M. Duclaux, modifions-les dans un rapport tel que l'acidité totale pour les dix prises soit égale à 100. Pour cela, il suffit de diviser chacun d'eux par 1,33 : la colonne α indique les nombres ainsi modifiés. On remarque immédiatement qu'ils vont en diminuant, comme pour l'acide butyrique.

La colonne A indique les acidités totales après chaque prise.

En comparant ces chiffres avec les nombres correspondants donnés par M. Duclaux, et en admettant que chaque acide se comporte dans le mélange comme s'il était seul, on peut calculer le rapport des équivalents d'acides butyrique et acétique contenus dans le liquide. Les différentes valeurs de ce rapport sont inscrites dans la dernière colonne ; leur moyenne est 2,6.

Les acides résultant de la fermentation renferment donc :

$$0^{gr},72 \times 88 = 63^{gr},3 \text{ d'acide butyrique}$$
$$\text{pour } 0^{gr},28 \times 60 = 16^{gr},8 \text{ d'acide acétique,}$$

c'est-à-dire environ 80 0/0 d'acide butyrique.

Les poids réels des acides formés sont donc :

$$\left.\begin{array}{l}\text{Acide butyrique} \ldots\ldots\ldots\ldots\ 6^{gr},685 \\ \text{Acide acétique} \ldots\ldots\ldots\ldots\ 1^{gr},775\end{array}\right\} 8^{gr},460.$$

L'équation suivante représente sensiblement les résultats de l'expérience :

$$46C^6H^{12}O^6 + 18H^2O = 224H + 94CO^2 + 15C^2H^4O^2 + 38C^4H^8O^2.$$

Voici, par comparaison, les nombres calculés d'après cette formule et ceux donnés par l'expérience :

	CALCULÉ	TROUVÉ.
Sucre employé		$16^{gr}.6$
Hydrogène	$0^{gr}.46$	$0^{gr},47$
Acide carbonique	$8^{gr},28$	$8^{gr},04$
Acide acétique	$1^{gr},80$	$1^{gr},775$
Acide butyrique	$6^{gr},70$	$6^{gr},685$

L'équation qui représente le phénomène est assez complexe ;

mais cette complexité disparaît quand on pénètre plus avant dans l'étude du mécanisme de cette fermentation.

L'examen attentif du tableau de la page 296 montre qu'entre le 3e et le 9e jour, les quantités d'acide carbonique et d'hydrogène dégagés sont approximativement les mêmes, ce qui veut dire qu'à ce moment, c'est sans doute l'équation

$$C^6H^{12}6^6 = 4H + 2CO^2 + C^4H^8O^2$$

qui donne la loi du phénomène. Or, cette formule est celle de la fermentation butyrique typique. C'est donc pendant les 3 premiers jours seulement qu'il se forme de l'acide acétique en même temps que de l'acide butyrique. Voyons si l'expérience vérifie cette conclusion.

Pour cela, j'ai fait, sur un ballon de trois jours, comparable au premier, la même étude que pour la fermentation complète, et je suis arrivé à l'équation :

$$53C^6H^{12}O^6 + 42H^2O = 312H + 114CO^2 + 30\,C^2H^4O^2 + 36C^4H^8O^2.$$

Les nombres correspondants étaient :

	CALCULÉ.	TROUVÉ.
Sucre employé		9gr,6
Hydrogène	0gr,344	0gr,32
Acide carbonique	5gr,00	4gr,73
Acide acétique	1gr,80	1gr,77
Acide butyrique	3gr,18	3gr,17

Si nous comparons ces chiffres à ceux du tableau précédent, nous trouvons que, entre le troisième et le neuvième jour, il s'est formé, par la disparition des 7 grammes de sucre qui restent :

Hydrogène	0gr,15 ou 1l,690
Acide carbonique	3gr,31 ou 1l,670
Acide acétique	0gr,005
Acide butyrique	3gr,515

Dans cet intervalle, il n'y a plus eu production d'acide acé-

tique : il s'est formé uniquement de l'acide butyrique, et, comme nous l'avions supposé, et comme on peut le vérifier, les nombres sont d'accord avec la formule

$$C^6H^{12}O^6 = 4H + 2CO^2 + C^4H^8O^2$$

équation de la fermentation butyrique.

L'importance de cette conclusion nous oblige à viser une objection qu'on pourrait nous faire. On pourrait dire que le dégagement gazeux s'étant fait librement dans l'expérience précédente, nous ne sommes pas sûrs que les gaz se dégagent dans la même proportion que celle dans laquelle ils sont produits, puisqu'ils sont inégalement solubles.

Pour répondre à cette objection, j'ai fait une série d'expériences dans le vide. La fermentation terminée, les gaz étaient recueillis à l'aide de la pompe à mercure.

En opérant sur le glucose, le saccharose, le lactose et le sucre obtenu par la fermentation de l'amidon à l'aide de l'amylozyme, les résultats ont été du même ordre. Je me bornerai à indiquer rapidement les chiffres correspondant à une expérience faite dans le vide avec le saccharose.

Fermentation du saccharose.— Du sucre candi blanc est dissous dans du bouillon de veau neutralisé (250 grammes de viande par litre d'eau). Je stérilise ce bouillon par filtration sur une bougie Chamberland flambée.

Un dosage à la liqueur de Fehling, après inversion, donne $4^{gr},88$ de sucre pour 100.

J'introduis 50^{cc} de cette dissolution dans une série de ballons à long col, contenant du carbonate de chaux, fermés par un tampon de coton et préalablement flambés.

Ces ballons, d'une capacité de 3 à 400^{cc}, sont ensemencés à la façon ordinaire; après avoir fait le vide, je les ferme, comme je l'ai indiqué plus haut pour les tubes à pommes de terre qui m'ont servi à retirer le bacille de l'eau. Ils sont ensuite placés à l'étuve à 35°.

Le lendemain, la fermentation commence. J'ai comparé, pour cette étude, les ballons dans lesquels la culture s'est manifestée au même moment.

L'analyse des gaz et des acides formés m'a donné les résultats consignés dans le tableau suivant :

	VOLUME DES GAZ DÉGAGÉS		RAPPORT des VOLUMES de gaz $\frac{H}{CO^2}$.	RAPPORT des ÉQUIVALENTS d'acides butyrique / acétique.	ACIDE CARBONIQUE provenant de la décomposition du carbonate de chaux.
	Hydrogène.	Acide carbonique.			
3e jour après l'ensemencement ...	175cc	95cc	65/35	26/74	10cc
4e jour	275cc	220cc	55/45	60/40	75cc
5e jour.....	350cc	310cc	53/47	72/28	90cc
11e jour (culture terminée)....	670cc	630cc	52/48	85/15	180cc

On voit que la proportion d'hydrogène va en augmentant dans le mélange gazeux ; il en est de même de l'acide butyrique.

De plus, l'étude successive des cultures permet d'établir les formules qui correspondent aux diverses périodes de la fermentation. Elle montre d'abord que le sucre de canne n'est pas interverti : puis, que la fermentation complète du saccharose peut être représentée par l'équation :

$$30C^{12}H^{22}O^{11} + 34H^2O = 240H + 116CO^2 + 10C^2H^4O^2 + 56C^4H^8O^2.$$

Voici, en effet, les nombres calculés d'après cette formule et ceux qui résultent de l'expérience :

	CALCULÉ.	TROUVÉ.
Sucre disparu		2gr,44
Hydrogène.....	0gr.0575	0gr,059
Acide carbonique	1gr,22	1gr,24
Acide acétique	0gr.142	0gr,142
Acide butyrique	1gr,172	1gr,180

Une fermentation arrêtée au bout de cinq jours, et en tous points comparable à la précédente, m'a conduit à la formule :

$$39C^{12}H^{22}O^{11} + 59H^{2}O = 344H + 152CO^{2} + 26C^{2}H^{4}O^{2} + 66C^{4}H^{8}O^{2}.$$

Les nombres correspondants ont été :

	CALCULÉ.	TROUVÉ.
Sucre disparu		1gr,18
Hydrogène	0gr,0304	0gr,031
Acide carbonique	0gr,591	0gr,610
Acide acétique	0gr,138	0gr,139
Acide butyrique	0gr,514	0gr,526

En comparant ces résultats à ceux qui correspondent à la fermentation complète, on peut se faire une idée de la transformation effectuée depuis le cinquième jour jusqu'à la fin de l'expérience.

On constate ainsi que la réaction, pendant cette période, est très approximativement représentée par l'équation suivante :

$$C^{12}H^{22}O^{11} + H^{2}O = 8H + 4CO^{2} + 2C^{4}H^{8}O^{2}.$$

Voici, en effet, les nombres calculés d'après cette formule, et ceux qui résultent de la comparaison des deux tableaux précédents :

	CALCULÉ.	TROUVÉ.
Sucre disparu		1gr,26
Hydrogène	0gr,0295	0gr,0285
Acide carbonique	0gr,65	0gr,631
Acide acétique	"	0gr,003
Acide butyrique	0gr,65	0gr,654

Fermentation du lactose. — Avec le sucre de lait, on obtient des résultats semblables; je me contenterai de les indiquer partiellement :

	RAPPORT des ACIDES FORMÉS $\frac{\text{butyrique}}{\text{acétique}}$.	MÉLANGES GAZEUX $\frac{H}{CO^2}$
2e jour de culture.....	40/60	60/40
3e —	46/54	58/42
4e —	59/41	56/44
8e — (fermentation achevée)...	75/25	52/48

L'étude complète des acides produits par la fermentation du lactose m'a montré que, dans les derniers jours de la culture, il se forme uniquement de l'acide butyrique comme pour les autres sucres.

Les mêmes expériences, répétées à la température de 20°, m'ont donné des résultats analogues, à cela près que les fermentations étaient plus lentes : elles duraient de 15 à 20 jours.

Causes de la production d'acide acétique au commencement des fermentations. — Tout se passe donc comme si la transformation du sucre en acide butyrique était le but final de la fermentation par l'amylozyme : à une période assez avancée, elle s'effectue seule; dans les premiers temps, au contraire, à cet acide s'en ajoute un autre plus oxygéné.

Quelle est la cause de cette variation? Y aurait-il des cellules transformant les sucres uniquement en acide butyrique et d'autres plus susceptibles de donner de l'acide acétique? J'ai cherché à éviter autant que possible cette influence de cellules différentes pouvant exister dans la semence, en prenant, comme je l'ai dit, une petite quantité d'une culture provenant d'une colonie unique.

Je crois, au contraire, que les générations successives des cellules initiales donnent des réactions chimiques différentes, parce que le milieu se modifie.

Il y a toujours, à l'origine, un peu d'oxygène dans les liquides de culture; j'ai constaté qu'il se forme d'autant plus d'acide acé-

tique que le vide est moins complet au commencement de l'expérience.

Mais la production de cet acide est-elle due uniquement aux traces d'air qui peuvent rester dans le liquide ? Serait-il possible, en éliminant complètement l'oxygène, d'obtenir, dès le premier jour, une fermentation butyrique pure ? Il est important d'élucider ce point, qui se rapporte à la vie même du microbe étudié.

J'ai opéré avec les tubes à deux branches, souvent employés par M. Pasteur, qui permettent de faire deux cultures successives, sans rentrée d'air.

J'introduis dans les deux branches un bouillon stérilisé contenant du glucose avec un peu de carbonate de chaux. L'une d'elles étant ensemencée, je fais le vide et je ferme à la lampe.

Dès le lendemain, à 35°, il se produit un dégagement de gaz. Je laisse l'appareil à l'étuve pendant quatre jours : à ce moment, ainsi qu'il résulte de mes expériences précédentes, il se forme uniquement de l'acide butyrique.

Si la présence de petites quantités d'oxygène était la seule cause de la formation d'acide acétique, une goutte de la première branche, introduite à ce moment dans la seconde, devrait y provoquer une fermentation butyrique pure. Je fais l'expérience de cette façon : dès le lendemain, la seconde branche fermente, et je détermine les acides qu'elle contient après un jour de culture.

L'analyse montre que le mélange ainsi obtenu renferme encore 25 à 30 0/0 d'acide acétique. La proportion de ce corps, bien qu'elle soit inférieure à celle que l'on trouve dans les cultures ordinaires, n'est cependant pas négligeable.

Or, pendant cette période, les spores, d'abord invisibles, apparaissent peu à peu ; et au moment où il se produit de l'acide butyrique seul, elles sont parfaitement formées.

Il y a lieu de penser que les variations des acides correspondent à des modifications dans la nature des bacilles avec leur âge plus ou moins avancé.

IV. — FERMENTATION DE LA MATIÈRE AMYLACÉE.

J'ai déjà dit que le bacille amylozyme pousse très bien sur la pomme de terre stérilisée : ce procédé a même été utilisé pour l'extraire de l'eau. Il pousse de même sur tous les milieux ren-

fermant de l'amidon cuit, haricots, lentilles, riz, tapioca, grains et farines de blé, de seigle et de maïs, mie de pain. Avec l'amidon cru, la culture est beaucoup plus lente, et ne réussit que si on ajoute un peu de bouillon comme liquide nutritif.

Ces cultures s'arrêtent quand l'acidité correspond à $0^{gr},10$ d'acide sulfurique pour 100_{cc}, comme dans les milieux sucrés. L'acide formé est encore un mélange d'acides acétique et butyrique ; la proportion d'acide butyrique augmente avec le temps, et le mélange gazeux devient de plus en plus riche en acide carbonique.

Ces résultats s'expliquent par la formation d'un sucre résultant de l'hydratation de la fécule, et susceptible de fermenter, comme le glucose, avec l'amylozyme.

Grâce à la sensibilité du microbe aux acides, le sucre reste en grande partie dans les cultures où il s'est formé ; on peut constater sa présence et l'en séparer. Il n'en serait pas de même si l'on empêchait l'acidité du milieu de se produire, en ajoutant aux pommes de terre un peu de carbonate de chaux pulvérulent; dans ces conditions, le sucre formé aux dépens de la fécule fermente au fur et à mesure de sa production ; et, l'expérience terminée, on trouve seulement un mélange d'acétate et de butyrate de chaux.

Alcool amylique. — Les cultures du bacille dans les milieux amylacés ont toujours une forte odeur d'alcool amylique et d'acide butyrique : il se produit en effet dans ces fermentations une petite quantité d'alcools éthylique et amylique.

Pour les étudier, je neutralise la liqueur en y ajoutant du carbonate de chaux et de l'eau de chaux. Je la filtre ensuite sur une bougie Chamberland, et j'obtiens un liquide jaune clair, que je distille à l'appareil Lebel.

Les produits condensés se séparent en deux couches : la portion qui surnage est peu soluble dans l'eau; elle se dissout, si l'on ajoute de l'alcool ordinaire.

Ce mélange contient des alcools éthylique et amylique. En y ajoutant de l'eau distillée, je l'amène à marquer 5° à l'alcoomètre de Gay-Lussac : étudiée au compte-gouttes, cette dilution a donné des résultats variant entre 210 et 218 gouttes.

Si l'on compare ces chiffres à ceux qui sont indiqués dans le

mémoire de M. Duclaux [1], on trouve que la proportion est de 25 à 28 0/0 d'alcool amylique, pour 72 à 75 0/0 d'alcool ordinaire.

Le volume d'alcools formés dans ces cultures est environ de $2^{cc},3$ à $2^{cc},5$ pour 100 grammes de pommes de terre employées.

Sucre. — Le sucre produit par la fermentation de l'amidon est très soluble dans l'eau. Il se dissout dans l'alcool à 80°, et non dans l'alcool absolu et l'éther. Je n'ai pas pu le faire cristalliser.

Il brunit quand on le chauffe en présence des alcalis et réduit la liqueur de Fehling à l'ébullition.

C'est donc un sucre très voisin du glucose ; il n'en diffère que par son pouvoir rotatoire, qui est beaucoup plus faible.

M. Fischer [2] a indiqué une réaction importante des sucres : les précipités qu'ils donnent avec la phénylhydrazine. J'ai étudié à ce point de vue celui qui se forme dans mes cultures.

Pour l'avoir aussi pur que possible, j'ai ensemencé le bacille, non plus sur des pommes de terre, mais dans un empois de fécule très léger.

La culture terminée, le liquide a été filtré sur une bougie Chamberland, et mélangé avec une dissolution fraîchement préparée, contenant trois parties d'acétate de soude, et deux parties de chlorhydrate de phénylhydrazine.

Le tout est maintenu pendant deux heures au bain-marie à 100°. Il se produit un abondant précipité jaune orangé, moins rouge que celui que l'on obtient dans les mêmes conditions avec le glucose.

Ce précipité est jeté sur un filtre et lavé jusqu'à ce que l'eau distillée qui le baigne s'écoule complètement incolore. Il est rassemblé dans une capsule en porcelaine et desséché à 100°.

On a ainsi une poudre à grains plus fins que ceux de la phénylglucosazone, obtenue de la même façon.

Ce corps est insoluble dans l'eau, mais se dissout très facile-

1. Duclaux, Sur la tension superficielle dans la série des alcools et des acides gras. *Annales de Chimie et Physique*, 5e s., t. VII, p. 273.

2. Em. Fischer, *Deutsche chemische Gesellschaft*, tome XVII, page 577. — *Bulletin de la Société chimique de Paris*, tome XLIII, n° 12, page 624.

ment dans l'alcool bouillant, auquel il donne une belle coloration rouge. Il s'en précipite par refroidissement ou par addition d'eau.

Chauffé avec les alcalis, il ne produit aucune coloration. Il réduit la liqueur de Fehling à l'ébullition, en donnant un précipité d'oxyde rouge de cuivre.

L'acide chlorhydrique le dissout en produisant une belle coloration rouge ; l'acide sulfurique également.

Le protochlorure d'étain le décompose avec dégagement de gaz : le mélange prend une teinte jaune rougeâtre.

Toutes ces réactions sont semblables à celles que donne la phénylglucosazone. Une légère différence existe dans les points de fusion : ce précipité fond entre 196° et 198°, tandis que celui qui correspond au glucose fond à 205°-206°.

Le sucre formé dans les cultures d'amylozyme au détriment de la fécule est donc voisin du glucose.

Transformations de la fécule. — Que devient la fécule dans les cultures sur pommes de terre? Quelles sont les proportions de sucre, d'alcools et d'acides formés par la décomposition d'un poids déterminé d'amidon?

J'ai fait plusieurs fois cette étude, et j'ai trouvé des résultats peu différents d'une culture à l'autre.

J'indiquerai ci-dessous les chiffres obtenus dans une expérience faite avec des pommes de terre qui contenaient 24 0/0 de matière sèche et 18 0/0 d'amidon.

25 grammes de ces pommes de terre sont additionnés de 200^{cc} d'eau et stérilisés à l'autoclave dans un ballon à long col. Après refroidissement, je les ensemence avec un peu d'amylozyme ; j'y fais le vide et je ferme le ballon à la lampe.

Six jours après, la culture étant complètement terminée, les gaz sont recueillis avec la pompe à mercure.

Voici les résultats trouvés :

Poids de fécule mis en fermentation . . .	$0^{gr},18 \times 25 = 4^{gr},5$
Fécule restant à la fin de la culture. . . .	0 gr.
Sucre	$3^{gr},52$
Hydrogène	253^{cc} ou $0^{gr},022$
Acide carbonique	207^{cc} ou $0^{gr},407$
Alcool éthylique	$0^{cc},44$ ou $0^{gr},347$
Alcool amylique	$0^{cc},10$ ou $0^{gr},082$
Acide acétique	$0^{gr},08$
Acide butyrique	$0^{gr},175$

Il est facile de comprendre que la formule représentant cette transformation est assez complexe. On peut cependant se faire une idée de la proportion de fécule transformée, en admettant que le carbone retrouvé dans les produits obtenus est tout entier emprunté à l'amidon.

3gr,52 de sucre correspondent à	3gr,17	de fécule
0gr,407 d'acide carbonique	0gr,25	—
0gr,347 d'alcool éthylique	0gr,41	—
0gr,082 d'alcool amylique.	0gr,12	—
0gr,08 d'acide acétique	0gr,07	—
0gr,175 d'acide butyrique.	0gr,21	—
Total	4gr,23	—

On retrouve donc 4gr,23 de fécule employée sur 4gr,5, c'est-à-dire 94 0/0. Quant aux 6 0/0 qui manquent, on peut penser qu'ils existent à l'état de dextrine. Il y a toujours dans la liqueur, en effet, un peu de dextrine résultant de la transformation incomplète de l'amidon.

70 0/0 de la fécule sont transformés en sucre ; 11 0/0 en alcools. On pourrait donc penser que la fermentation alcoolique de ce sucre ne peut donner un rendement supérieur à 81 0/0.

Les expériences que je vais indiquer montrent cependant que l'on peut retrouver à l'état d'alcool jusqu'à 85 et 90 0/0 de la fécule employée.

Fermentation alcoolique du sucre de fécule. — Ce sucre possède, en effet, comme le glucose, la propriété de donner des fermentations alcooliques avec la levure de bière.

Je stérilise à l'autoclave une culture d'amylozyme sur pommes de terre, et, après refroidissement, j'y ajoute un peu de levure. Bientôt la fermentation commence et transforme le sucre en alcool; elle est terminée au bout de huit à dix jours.

Mais, il est inutile de détruire par la chaleur le microbe saccharifiant l'amidon : il suffit d'introduire la levure de bière dans la culture à un moment quelconque.

On peut même ensemencer à l'origine un mélange d'amylozyme et de levure jeunes : tout se passe comme si chacun des microbes était seul; le bacille décompose la fécule et fournit à la levure le sucre dont elle a besoin. Leurs vies combinées transforment ainsi directement l'amidon en alcool.

Ce fait d'une symbiose de deux microbes, dont l'un, par sa

vie même, fournit à l'autre l'aliment qui lui est nécessaire, est très curieux à observer. Des expériences faites dans cet ordre d'idées permettraient certainement d'arriver à des transformations chimiques plus complètes et d'obtenir des résultats intéressants.

Dans une expérience à 35°, un kilogramme de pommes de terre a donné 109^{cc} d'alcool absolu. Dans une deuxième expérience, j'ai trouvé 110^{cc}. Dans une troisième, à la température de 20°, j'ai obtenu 105 centimètres cubes.

Ce procédé des cultures simultanées de l'amylozyme et de la levure, permet donc de retirer de la pomme de terre environ 90 0/0 de la quantité d'alcool que pourrait fournir sa fécule.

Ce rendement est supérieur à celui qui résulterait de l'analyse (page 308). Cela tient à deux causes : 1° dans ces conditions, il y a très peu de fécule incomplètement transformée et restant à l'état de dextrine ; 2° la proportion d'acides acétique et butyrique formés est moins considérable.

Les grains, les farines et tous les milieux amylacés peuvent fermenter alcooliquement de la même façon. J'ai obtenu ainsi de l'alcool provenant de farines de blé, de maïs, de seigle et d'orge. La seule condition pour que la fermentation marche bien est que le milieu ne soit pas trop concentré.

Production de l'alcool amylique. — L'alcool produit par les deux microbes réunis contient de l'alcool amylique, comme tous ceux que l'on obtient avec la pomme de terre.

La présence de ce corps est-elle due uniquement à l'action de l'amylozyme sur l'amidon, ou bien le sucre de fécule, en fermentant avec la levure de bière, en donnerait-il de petites quantités ?

Pour le savoir, j'ai retiré le sucre d'une culture, et je l'ai dissous dans de l'eau de levure.

En distillant le liquide, je constatais d'abord que les portions condensées ne renfermaient aucune substance capable de faire varier les indications du compte-gouttes, c'est-à-dire marquaient exactement 100 gouttes, comme l'eau distillée.

Après l'avoir stérilisé et laissé refroidir, je semais un peu de levure pure dans le liquide ainsi préparé, et je faisais simultanément la même expérience sur le glucose.

Ces fermentations étaient abandonnées pendant quelques jours. Toutes deux m'ont donné le même résultat : en rassem-

blant par distillation l'alcool formé, et amenant les produits condensés à marquer 5° à l'alcoomètre, j'ai trouvé 129 gouttes, c'est-à-dire le nombre indiqué par M. Duclaux pour l'alcool éthylique pur.

La fermentation alcoolique du sucre de fécule par la levure ne donne donc pas d'alcool amylique : celui que l'on constate dans les fermentations de l'amidon par l'amylozyme et la levure est dû, par conséquent, à la vie du premier de ces microbes.

Alcool amylique dans les alcools industriels. — Mais alors, comment comprendre que les alcools de pommes de terre industriels contiennent de l'alcool amylique ?

On peut l'attribuer à ce que, dans l'industrie, on ne fait pas de cultures pures. L'expérience suivante le démontre :

200 grammes de pommes de terre cuites sont étendues d'eau, additionnées de 10 grammes de farine de maïs, et de 40 grammes de malt.

Je maintiens le mélange trois heures à 55°-58° ; l'amidon est alors presque complètement transformé en sucre. Le liquide est filtré, stérilisé ensuite et ensemencé avec de la levure pure.

Quelques jours après, je distille la culture à l'appareil Lebel ; les portions condensées, marquant 5° à l'alcoomètre, donnent exactement 129 gouttes : il se produit donc uniquement de l'alcool éthylique.

Il en résulte que la présence d'alcool amylique dans les fermentations industrielles est due aux microbes étrangers, qui se développent concurremment avec la levure.

Or, j'ai indiqué que l'amylozyme résiste 10 jours à 50°-55°, et qu'il conserve la faculté de se développer sur l'amidon, lorsqu'on le ramène à une température convenable. On peut penser que ce bacille, et d'autres semblables existant dans l'eau, trouvent dans la fécule, qui n'est jamais complètement saccharifiée, un milieu favorable à leur vie, et peuvent se développer, grâce à l'acide carbonique dégagé par la levure.

Conclusion. — Les résultats que j'ai exposés montrent que la nature d'un microbe, son âge, les conditions de milieu dans lesquelles il se propage, peuvent apporter des changements dans le développement et les produits de la fermentation.

Celui que je viens d'étudier donne en effet des transformations assez simples dans le cas des sucres, plus compliquées avec l'amidon.

Les produits de la fermentation des sucres sont à l'origine variables et plus oxydés. Mais, l'on peut dire, d'une façon générale, que tous les sucres, après cette période de variation, se transforment en acide butyrique, avec dégagement de volumes égaux d'hydrogène et d'acide carbonique.

Les différences que l'on constate au commencement de ces cultures sont dues à deux causes : 1° à des modifications dans la vie du microbe; 2° à la quantité plus ou moins considérable d'oxygène libre ou dissous restant dans le milieu de culture.

La première de ces circonstances se rapporte à la vie intime du bacille; la seconde est purement occasionnelle.

Dans un autre chapitre, j'ai montré que ce microbe transforme l'amidon en un sucre fermentescible.

Au moyen de cultures simultanées du bacille et de la levure, j'ai obtenu une fermentation alcoolique de l'amidon; le rendement peut aller jusqu'à 90 0/0 de la quantité théorique.

Cette étude m'a conduit à penser que la présence de l'alcool amylique dans les alcools de pommes de terre et de grains fabriqués dans l'industrie tient aux impuretés des fermentations, et, en particulier, à une culture de microbes anaérobies, pour lesquels l'amidon est un aliment.

DYSENTERIE ÉPIZOOTIQUE DES POULES ET DES DINDES

Par M. Ad. LUCET, vétérinaire, a Courtenay (Loiret).

---

§ I

Malgré les travaux dont elle a été l'objet, la maladie des oiseaux de basse-cour connue sous le nom de *choléra des poules*, est encore, dans la pratique, fréquemment confondue avec d'autres affections virulentes qui lui ressemblent par quelques-uns de leurs symptômes, sévissent, comme elle, sur tout ou partie des oiseaux de la ferme, mais ne sont pas justiciables du même vaccin. De là, très probablement, la cause des résultats négatifs parfois obtenus dans l'emploi du vaccin du choléra des poules. La distinction de ces affections présente donc une certaine importance.

Déjà Bénion, en 1873, en se basant sur leurs symptômes, leur durée et les oiseaux atteints, sépare du choléra deux maladies: l'une, une épizootie ayant, en 1864, exclusivement sévi sur les poules et les dindes de la Haute-Vienne, et que, d'après le Dr Lemaistre[1], il décrit sous le nom de *Typhus*[2]; l'autre, une affection qu'il appelle *Entérite dysentérique*, et qu'il indique comme « ayant fort souvent décimé et parfois dépeuplé en partie les basses-cours d'un canton, d'un arrondissement, voire d'un département tout entier[3] ».

En 1877, Mégnin[4] signale, comme pouvant atteindre tous

1. Lemaistre, Épizootie (Typhus) des Gallinacés; *Recueil de Médecine vétérinaire*, 1869, page 376.
2. Bénion, *Traité de l'élevage et des maladies des animaux et des oiseaux de basse-cour et d'agrément*, 1873, page 463.
3. Bénion, *loc. cit.*, page 316.
4. *Maladie des oiseaux*, page 116.

les oiseaux mal entretenus, une maladie virulente qu'il sépare du choléra et qu'il nomme *Septicémie*, mais dont la description qu'il en donne se rapporte si bien à celle du typhus de Lemaistre et de Bénion, qu'elle semble en être la copie.

N'ayant d'intérêt qu'au point de vue historique, ces distinctions ont fait place depuis à d'autres plus précises, basées sur les résultats fournis par la méthode expérimentable.

Les premiers, Eberth[1] et Wolff[2] différencient du choléra des volailles une *affection diarrhéique des perroquets*, caractérisée par une grande faiblesse, des convulsions et la mort, et par la présence, dans le sang et les lésions des oiseaux qui succombent, d'un *microorganisme rond spécial*, affection paraissant répondre à la *Dysenterie des perroquets*, décrite par Percheron (*Le Perroquet*), Bénion et Mégnin (*l. c.*).

En 1884, Pétri observe chez des *oies*, des *canards* et des *poules*, une épidémie dans laquelle le sang des malades, qui meurent après avoir présenté du refroidissement et des convulsions, renferme le *bacille de la Septicémie expérimentale du lapin*[3].

Quatre ans plus tard, Cornil et Toupet étudient, sous le nom de *choléra des canards*, une maladie sévissant sur ces palmipèdes au Jardin d'acclimatation, maladie non inoculable aux poules, caractérisée par de la diarrhée, des temblements et la présence, dans le sang des malades, d'un *bacille particulier*[4].

Enfin, en 1889, Klein publie, dans le *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, un travail sur une *Entérite infectieuse*, propre aux *poules*, non virulente pour les pigeons, et reconnaissant pour cause un microbe qu'il appelle *bacillus gallinarum*.

Voici une autre affection, infectieuse, diarrhéique, particulière aux *poules* et aux *dindes*, se rapprochant beaucoup de l'Entérite de Klein, dont elle diffère cependant, mais qui pourrait bien être l'une de celles décrites par Lemaistre, Bénion et Mégnin, sous les noms de Typhus, d'Entérite dysentérique et de Septicémie, et que, pour éviter toute confusion, j'appellerai *Dysenterie épizootique des poules et des dindes*.

1. *Virchow's Archiv.* Bd. 80, 1880.
2. *Virchow's Archiv.* Bd. 92, 1883.
3. *Centralblatt f. die med. Wissenschafft*, nov. 1884.
4. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 1888.

§ II. — MARCHE ET SYMPTOMES DE LA MALADIE.

Assez commune dans ma région, où tous les ans, du printemps à l'automne, elle existe dans un certain nombre de fermes, la dysenterie épizootique des poules et des dindes est une maladie infectieuse, diarrhéique, respectant les canards, les oies et les pigeons, inoculable aux lapins par injection intraveineuse seulement, peu susceptible d'extension, s'éteignant ordinairement sur place, à marche relativement lente et non invariablement mortelle.

Sévissant indistinctement sur les poules de tout âge, quelle qu'en soit la race, elle frappe généralement cependant plutôt les poules de l'année, chez qui elle est plus rapidement mortelle. Il en est de même des dindes qui, toutefois, résistent mieux.

Restant habituellement localisée à la ferme qu'elle a envahie, elle s'y maintient un mois ou deux en provoquant, dans les premières semaines, une mortalité sensible qui, peu à peu, devient plus rare ; puis elle disparaît après avoir détruit le quart, le tiers ou la moitié, rarement plus, de la population des poulaillers.

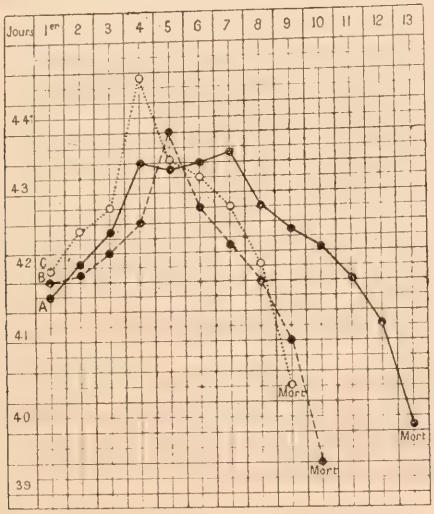
Fréquente surtout pendant l'été, elle apparaît ordinairement aux premières chaleurs, et disparaît à l'automne. Jamais je ne l'ai observée pendant la saison froide,

Elle offre une période d'invasion bien caractérisée, d'une durée de trois à quatre jours, que les éleveurs eux-mêmes distinguent parfaitement, et pendant laquelle les individus atteints perdent l'appétit, recherchent les liquides, deviennent nonchalants, tristes, restent isolés, en même temps que leur crête pâlit, que leurs excréments, encore solides, prennent une teinte verte, et que leur température rectale s'élève de un ou deux degrés.

A la période d'état, il apparaît une diarrhée d'abord muqueuse, abondante, vert bleuâtre, accompagnée d'une inappétence absolue et d'une soif vive. Le dos voussé, les plumes hérissées, ternes, salies autour de l'anus par les déjections, les malades alors laissent pendre leurs ailes, bâillent fréquemment, marchent avec peine, titubent, et restent des heures entières dans la même position, immobiles, somnolentes, les paupières demi fermées, indifférentes à ce qui se passe autour d'elles.

Quatre à cinq jours plus tard, la diarrhée se montre jaunâtre, parfois rougeâtre ou striée de sang, uniquement constituée par l'exsudat intestinal ou séreux, et s'accompagne de ténesme ; la crête s'affaisse, se décolore davantage, puis revêt une teinte légèrement violacée qui s'accuse plus encore après la mort : les bâillements deviennent continuels, les extrémités se refroidissent, la somnolence augmente : amaigries, accroupies, anéanties, la tête touchant le sol, les malades laissent échapper par le bec des matières grisâtres, gluantes, dont l'écoulement est surtout abondant quand on les suspend par les pattes, puis tombent sur le côté, se débattent quelques instants et meurent de 9 à 13 jours après l'apparition des premiers symptômes.

Du niveau élevé où elle était arrivée dans les premiers jours, la température rectale, pendant cette période, descend progressivement, lentement d'abord, puis rapidement le dernier jour, où elle est alors de 1, 2 ou 3 degrés au-dessous de la normale.



Tracés thermométriques obtenus : *A, chez une poule inoculée dans le tissu conjonctif sous-cutané avec une culture à l'abri de l'air; B et C, chez deux poules toutes deux inoculées dans le tissu cellulaire sous-cutané avec une culture au contact de l'air.*

Telle est, généralement, la physionomie de cette affection qui peut cependant varier dans sa manière d'être.

Quelquefois, en effet, elle est moins rapidement mortelle : la torpeur alors est coupée de temps à autre, au début de la période d'état qui se prolonge, par un réveil de quelques heures, pendant lesquelles il y a recherche des aliments; mais la diarrhée persistant avec tous ses caractères, l'amaigrissement s'accentue, l'état cachectique s'accuse, la muqueuse buccale et les conjonctives blanchissent, la crête devient flasque, toutes les plumes se salissent et l'épuisement est extrême quand, au bout d'une vingtaine de jours, la mort survient.

Dans certains cas, sa marche est encore plus lente, et les malades, après avoir végété pendant un temps indéfini, quelquefois assez long, ou reviennent lentement à la santé, ou après avoir présenté des alternatives de mieux et de plus mal, meurent dans un brusque retour de la maladie à l'état aigu, ou de l'anémie qu'elle a provoquée.

Parfois enfin, des poules, après avoir été malades pendant huit à dix jours, retrouvent peu à peu leur gaieté et l'appétit, et la diarrhée disparaissant, se rétablissent promptement sans paraître se ressentir des atteintes du mal.

§ III. — ANATOMIE PATHOLOGIQUE.

Les lésions que l'on rencontre à l'autopsie des sujets qui succombent varient suivant la rapidité avec laquelle la maladie a évolué.

Chez les animaux morts à la période aiguë, le *sang*, incoagulé, terne, gris, contient de nombreuses petites gouttelettes graisseuses; le *péricarde* renferme une certaine quantité de liquide séreux, grisâtre ; le *cœur*, flasque, est souvent parsemé de petites taches pétéchiales; les *poumons*, généralement normaux, sont parfois légèrement hypérémiés; fréquemment il existe un léger épanchement abdominal, séreux, grisâtre; le *foie*, énorme, friable, fortement coloré, laisse écouler, à l'incision, une grande quantité de sang; la vésicule biliaire est généralement distendue; la *rate*, noire, est considérablement hypertrophiée; les *reins* sont congestionnés; le *mésentère* présente une arborisation intense; enfin, l'*intestin*, injecté, renfermant un abondant liquide muqueux ou séreux, jaunâtre ou verdâtre, a sa muqueuse infiltrée de nombreuses extravasations sanguines.

Quand, au contraire, les malades ont succombé à la période chronique, l'autopsie révèle, avec quelques lésions inflammatoires intestinales, le retour de la rate à son volume normal; une coloration grise particulière du foie, qui semble légèrement atrophié; une altération du sang qui apparaît grisâtre, blafard, pâle; une atrophie du cœur qui est mou, flasque, et enfin une myocardite parenchymateuse caractérisée par la présence, dans l'épaisseur du muscle cardiaque, surtout au niveau des ventricules, de points jaunâtres, fermes, pouvant atteindre les dimensions d'un petit pois rond, tranchant nettement sur le tissu environnant, rougeâtre, et situés profondément ou superficiellement, mais alors en saillie.

L'examen microscopique de la diarrhée et des épanchements péricardique et abdominal les montre constitués : la première, par un liquide muqueux, gluant, filant ou séreux, contenant des globules sanguins normaux ou déformés, des cellules épithéliales desquammées, des leucocytes, et un nombre considérable de bactéries sur lesquelles je reviendrai plus loin; les seconds, par un liquide plus fluide, dans lequel nagent quelques cellules épithéliales détachées de la séreuse, isolées ou en plaques, des éléments lymphatiques et des bactéries abondantes.

L'étude histologique des lésions aiguës, pratiquée sur des coupes minces prélevées après durcissement par l'alcool absolu, colorées au picrocarminate d'ammoniaque et montées dans la glycérine, fait voir :

Dans les reins, les capillaires distendus, les glomérules ecchymosés et quelques hémorragies interstitielles;

Dans la rate, des foyers hémorragiques, nombreux surtout près de la capsule fibreuse, et masquant le tissu propre de la glande;

Dans le foie, les capillaires, remplis de globules sanguins. énormes, variqueux, repoussant les cellules hépatiques qui, là, sont atrophiées et granuleuses; et les veines centrales de quelques îlots, entourées d'une zone de tissu conjonctif de nouvelle formation dans laquelle existent des cellules connectives abondantes (Pl. VIII, fig. 4);

Dans l'intestin, dont les capillaires turgides, vus en plan dans la muqueuse détachée, colorée et montée dans le baume, donnent

l'aspect d'une magnifique injection naturelle (fig. 2); l'épithélium disparu, le tissu conjonctif muqueux infiltré, parfois de globules sanguins extravasés, toujours de nombreuses cellules lymphatiques, abondantes également autour des vaisseaux du tissu conjonctif sous-muqueux;

Dans le cœur enfin, une dilatation des capillaires et quelques hémorragies interstitielles.

La même étude, appliquée aux lésions chroniques, montre :

Une diminution sensible des globules sanguins qui sont faiblement colorés;

Une dégénérescence granulo-graisseuse des cellules hépatiques qui, atrophiées et se colorant mal, contiennent des granulations pigmentaires et des corpuscules de graisse;

Et dans le myocarde, la présence de foyers inflammatoires constitués par des cellules lymphatiques disséminées, infiltrant et refoulant les fibres cardiaques qui ont perdu leur striation, ou réunies en amas à la place du tissu musculaire dont il existe encore quelques fibrilles atrophiées, sans caractères, noyées au milieu des éléments embryonnaires qui forment de petits abcès entourés d'une zone de tissu cardiaque moins altéré, mais hypérémié, et dont les vaisseaux capillaires, distendus, sont nombreux et très apparents. (Fig. 1.)

Le produit du raclage de toutes ces lésions, aiguës ou chroniques, coloré sur lamelles à l'aide d'une solution hydro-alcoolique de violet de gentiane ou de fuchsine, laisse voir des bactéries d'autant plus abondantes que les lésions sont plus aiguës, et qui existent également dans le sang, mais en petite quantité.

§ IV. — LA MALADIE EST VIRULENTE.

La dysenterie épizootique des poules et des dindes est *inoculable* (A) de la poule à la poule, de la poule à la dinde, de la dinde à la dinde, et réciproquement. Elle est de plus, chez ces deux espèces, *transmissible* par ingestion (B).

A

Le 22 septembre 1890, *deux poules* et *une dinde*, gravement malades, me sont adressées par un fermier chez qui la maladie sévit depuis quinze à dix-huit jours.

L'une des poules meurt dans la nuit du 23 au 24 septembre, et son autopsie révèle tout le cortège des lésions aiguës précédemment indiquées.

Avec toutes les précautions usitées en pareil cas, sa rate isolée, puis broyée dans vingt centimètres cubes de bouillon de veau stérilisé, sert à inoculer, le 24 septembre, à huit heures du matin :

(*a*) Dans le tissu conjonctif sous-cutané :

I. Une poule qui, atteinte de diarrhée le 27 septembre, meurt le 7 octobre, et dont le sang, le foie, la rate donnent des cultures sur gélatine.

II. Une poule qui se rétablit, après avoir présenté, dès le 28 septembre, de la diarrhée verte, de l'inappétence, une soif vive, la décoloration de la crête, de la somnolence, etc.

(*b*) Par injection intra-veineuse :

III. Une poule qui meurt dans la nuit du 26 au 27 septembre, sans avoir eu de flux diarrhéique, mais qui montre, les 25 et 26, un abattement profond, une inappétence complète et dont l'autopsie fait voir une hypertrophie du foie et de la rate. Avec ces deux organes, on obtient des cultures sur gélatine.

L'autre poule succombe le 25 septembre, à 11 heures du matin. Le même jour à 1 heure du soir :

IV. Du sang, prélevé dans le cœur, avec une pipette flambée, délayé dans cinq centimètres cubes d'eau distillée stérilisée, est inoculé dans le tissu cellulaire sous-cutané d'une poule. Celle-ci se montre, les jours suivants, triste, altérée, sans appétit, puis atteinte le 1er octobre d'une légère diarrhée qui disparaît le surlendemain et est suivie d'une amélioration notable et plus tard d'une guérison complète.

V. Un morceau de foie, broyé dans 15cc d'eau stérilisée, sert à inoculer, dans le tissu conjonctif sous-cutané, une poule qui, après avoir été fort malade pendant huit jours, résiste à l'injection et se rétablit. Du sang retiré aseptiquement d'une des veines axillaires, le 3 octobre, cultive sur gélatine.

Le dinde meurt le 28 septembre.

Avec sa rate, broyée dans vingt-cinq centimètres cubes de bouillon de veau stérilisé, deux poules sont inoculées dans le tissu conjonctif sous-cutané.

Après avoir présenté toutes deux les symptômes caractéristiques de la maladie, l'une (VI) meurt au bout de douze jours; l'autre (VII), au bout de vingt-deux jours, avec, à l'autopsie, une myocardite accentuée.

Avec la rate de la poule I, une jeune dinde (VIII) est inoculée dans le tissu conjonctif sous-cutané, le 7 octobre. La diarrhée apparaît chez elle le 12 octobre et la mort survient le 22. Son sang cultive.

Le 22 octobre, une autre dinde (IX) reçoit, dans le tissu conjonctif de la région pectorale, une dilution de la pulpe de la rate de la dinde VIII. Après avoir présenté des symptômes graves pendant douze jours, elle résiste.

B

Le 24 septembre, deux poules reçoivent comme nourriture l'intestin, le foie et le cœur hachés de la poule morte ce jour et qui m'avait été remise par le fermier le 22 septembre.

L'une (X) est atteinte de diarrhée le 28 et meurt le 4 octobre. Le sang cultive ainsi que le foie.

L'autre (XI), atteinte de diarrhée le même jour, meurt le 16 octobre. A l'autopsie, myocardite. Cultures positives avec la rate.

Le 22 octobre, deux poules mangent, l'une l'intestin, l'autre le foie de la dinde VIII morte ce jour.

La première (XII) est atteinte de diarrhée le 25, et meurt le 2 novembre. Cultures positives avec le sang.

La seconde (XIII), chez qui la diarrhée apparaît le 27, succombe le 10 novembre seulement. Foie et rate, hypérémiés et hypertrophiés, donnent des cultures positives.

XIV. Le 10 novembre, une jeune dinde mange, mélangés à du son mouillé, le foie, la rate et l'intestin hâchés de la poule XIII. Atteinte de diarrhée verte le 14, elle meurt le 23. Cultures positives avec le sang.

§ V. — ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE.

Le sang, le foie, les reins, la rate, l'intestin des poules et des dindes qui succombent à la dyssenterie épizootique, renferment un bacille court, de 1 μ 2 à 1 μ 8 de longueur, le plus souvent en deux articles accolés bout à bout, mais parfois isolé, animé de légers mouvement de trépidation, se laissant facilement imprégner par les solutions hydro-alcooliques de violet de gentiane, de violet de méthyl et de chlorhydrate de rosaniline, mais ne prenant ni le Gram, ni le Weigert. (Pl. VIII, fig. 3.)

En petite quantité dans le sang, moins rare dans les reins et le foie, abondant dans la rate, il est en amas prodigieux dans le mucus intestinal, où, lorsque la maladie revêt une forme franchement aiguë, il existe fréquemment à l'état de pureté absolue.

On pourrait croire que le sang, pauvre en bactéries après la mort, n'en contient pas dans le cours de l'affection. Il n'en est rien cependant. Pendant la vie, en effet, on obtient des résultats positifs, dès l'apparition de la diarrhée, par la culture de sang prélevé, avec pureté, dans l'une des veines axillaires.

A la fois aérobie et anaérobie, ne poussant pas sur pomme de terre, se développant bien dans les bouillons de veau peptonisés et alcalins, liquides ou solides, et surtout dans le bouillon de

poule naturel, neutre ou légèrement acide, où il conserve plus longtemps sa virulence, mais ne proliférant pas dans les substratums fortement acidulés par l'acide lactique, ce bacille cultive peu à la température de la chambre, lentement à 18-20°, rapidement au contraire à 37-38°, en ne changeant pas la réaction des milieux alcalins, mais en rendant alcaline celle des milieux primitivement neutres ou acidulés.

Ensemencé dans une goutte de bouillon de veau suspendue en cellule humide, il se développe d'abord isolément, puis se réunit en zooglées immobiles.

Dans la gélatine, en plaques, il donne de petites colonies régulièrement circulaires, saillantes, ayant l'aspect de gouttelettes de cire, blanches, brillantes, humides, qui, plus tard, prennent en grossissant une forme convexe accentuée, leur développement ayant plutôt lieu en hauteur qu'en surface. Vues au microscope et par transparence, ces colonies, à contours nets et bien délimités, se montrent légèrement chagrinées dans leur centre qui est jaune brunâtre, tandis que leurs bords ont une couleur jaune plus claire.

Cultivé dans le même milieu, en traînée sur surface oblique, où il fournit des cultures caractéristiques, il forme une couche blanc grisâtre ou blanc sale, humide, muqueuse, à bords réguliers, ne dépassant pas les limites tracées par l'anse inoculatrice, mais s'accroissant en épaisseur jusqu'à ce que celle-ci atteigne un volume suffisant pour rompre la force adhésive qui l'unit au substratum nutritif. Coulant alors sur le plan incliné où elle repose, cette couche s'amasse au fond du tube de culture, en y formant un dépôt qui, en vieillissant, devient légèrement rougeâtre dans ses parties profondes, pendant que la surface qui la supportait n'offre plus à l'œil qu'une très mince traînée grisâtre. A aucun moment la gélatine n'est liquéfiée.

Il produit par piqûre, toujours dans la même substance, une ligne droite grisâtre, punctiforme, et, à la surface, une plaque circulaire, saillante, de même teinte ou un peu plus blanche.

Sur gélose, en surface oblique, il fournit un revêtement épais, à bords rectilignes ou très légèrement dentelés, blanc jaunâtre, muqueux : en profondeur, une ligne droite, grise, tomenteuse avec une plaque circulaire superficielle, brillante et plus blanche.

Ensemencé enfin dans du bouillon de veau ou de poule, peptonisé ou non, neutre, alcalin ou à peine acide, il y détermine un trouble accentué, suivi de la formation d'un dépôt grisâtre, pulvérulent, abondant, surmonté du bouillon redevenu limpide, mais muqueux, filant.

Dans le vide, la physionomie de toutes ces cultures reste la même; toutefois, l'aspect coulant des cultures sur gélatine tarde davantage à se manifester.

Invariable quel que soit le mode de culture employé, à l'air ou dans le vide, la durée de la virulence varie sensiblement, par contre, suivant la réaction et la nature du milieu nutritif.

Dans du bouillon de veau peptonisé et alcalin, le bacille perd assez vite ses propriétés pathogènes, même lorsqu'on a le soin de renouveler les cultures tous les trois ou quatre jours.

Incapable alors de causer la mort des poules auxquelles on l'inocule, quelle que soit la voie choisie, il détermine, dans ce cas, un malaise passager, peu intense dans les inoculations sous-cutanées, plus accentué dans les inoculations intra-veineuses, et conférant aux sujets d'expérience l'immunité contre des cultures très virulentes.

XV. — Le 10 novembre, j'inocule trois poules dans le tissu conjonctif sous-cutané, chacune avec un centimètre cube d'une sixième culture dans du bouillon de veau peptonisé et alcalin, ayant séjourné huit jours à l'étuve à 37-38°. Après avoir été tristes pendant quelques jours, elles retrouvent leur gaieté et paraissent ne rien ressentir. Réinoculées de nouveau le 30 novembre, avec une culture récente dans du bouillon de poule, elles résistent, tandis qu'une poule témoin succombe le 11 décembre, à une injection faite le même jour, sous le tissu cellulaire sous-cutané, de un centimètre cube de cette dernière culture.

XVI. — Le 21 novembre, deux poules reçoivent, dans une des veines axillaires, chacune un centimètre cube d'une huitième culture dans du bouillon de veau peptonisé et alcalin, ayant séjourné quinze jours à l'étuve à 37-38°. Très malades toutes deux les jours qui suivent, elles se rétablissent et supportent, sans inconvénient, une nouvelle inoculation, faite le 15 décembre, dans le tissu conjonctif sous-cutané, avec un centimètre cube d'une culture âgée de deux jours, dans du bouillon de poule naturel, pendant qu'une poule témoin meurt en douze jours à une inoculation semblable et égale de la même culture.

Mais, si on le cultive dans du bouillon de poule naturel,

neutre ou légèrement acide, sa virulence, qui ne s'affaiblit alors que lentement, si on laisse les cultures séjourner à l'étuve sans les rajeunir, reste intacte pendant longtemps, si on prend la précaution de faire un nouvel ensemencement, lorsque la réaction du milieu nutritif devient alcalin sous l'influence des échanges nutritifs qu'y détermine la prolifération du microorganisme.

D'un autre côté, quand son action pathogène a été atténuée, pour une cause ou une autre, il est assez facile de lui faire récupérer son intensité à l'aide de cultures en série dans les bouillons de poule, et cette influence des milieux sur la virulence permet d'expliquer certaines particularités que l'on observe dans la transmission de la maladie à l'état spontané ou expérimental.

Quant à sa vitalité, elle est assez prononcée.

Des cultures dans la gélose, la gélatine ou les bouillons, renfermées dans des pipettes capillaires, fermées à la lampe à une extrémité et bouchées à l'autre par un tampon d'ouate, ou scellées aux deux bouts, cultivent encore, en effet, après un séjour de trois mois à l'étuve à 37-38°, ou après avoir été exposées pendant le même laps de temps (27 septembre au 3 janvier), sur une fenêtre faisant face au midi, à toutes les variations atmosphériques.

Enfin, il cultive aussi après un séjour, à l'état humide, dans des pipettes closes ou non, de quinze minutes dans de l'eau à 50°, et de cinq minutes dans de l'eau à 60°. Toutefois, il est tué, dans les mêmes conditions, après vingt minutes à 50° et dix minutes à 60°.

§ VI. — VIRULENCE DES CULTURES.

Le microbe isolé est bien l'agent de la maladie :

Des cultures récentes, en effet, faites dans du bouillon de poule et entretenues en série, à l'air ou dans le vide, déterminent invariablement, quel que soit leur rang dans la série, l'éclosion de la maladie chez les poules auxquelles on les inocule, soit dans le tissu conjonctif sous-cutané, soit dans le sang.

XVII. — Le 6 octobre, une poule reçoit, en inoculation sous-cutanée, un centimètre cube d'une troisième culture. Le 9, elle est atteinte de diarrhée, et meurt le 17. Son foie et sa rate, énormes, cultivent.

XVIII. — Le 25 octobre, une poule est inoculée sous la peau, avec un centimètre cube d'une huitième culture. Atteinte de diarrhée le 29, elle meurt à la période chronique le 22 novembre. Son autopsie montre de la myocardite, et sa rate cultive.

XIX. — Le même jour, j'injecte un centimètre cube de la même culture, dans une des veines axillaires d'une poule, qui meurt le 28, sans avoir présenté de flux diarrhéique. Le foie et le sang cultivent.

XX. — Le 21 novembre, une poule est inoculée dans le tissu cellulaire sous-cutané, avec un centimètre cube d'une quinzième culture. Diarrhée le 25, mort le 3 décembre. Son intestin, donné à manger à une poule, la fait mourir le 15 décembre.

§ VII. — ACTION DES CULTURES CHEZ D'AUTRES ANIMAUX.

Les cultures du bacille de la dysenterie des poules, sans action chez le pigeon (*a*) par inoculation sous-cutanée, non virulentes pour le cobaye (*b*) soit en injection sous la peau, soit en injection intra-péritonéale, et également inoffensives dans les mêmes conditions chez le lapin (*c*), tuent ce dernier animal, dans un court délai, par inoculation intra-veineuse (*d*).

(*a*) Le 19 octobre, un pigeon reçoit dans le tissu conjonctif sous-cutané, un centimètre cube d'une troisième culture dans du bouillon de poule. A aucun moment il ne paraît en souffrir. Le 21 novembre, un second pigeon est inoculé sous la peau, avec un centimètre cube d'une quatrième culture dans du bouillon de poule. Résultat négatif.

(*b*) Deux cobayes sont inoculés sous la peau, le 25 septembre, avec une culture provenant de l'une des poules atteintes de la maladie spontanée.

Le même jour, deux autres cobayes reçoivent, dans le péritoine, chacun un centimètre cube de la même culture.

Tous ces animaux restent en bonne santé.

(*c*) A la même date, quatre lapins reçoivent chacun un centimètre cube de la culture précédente, savoir : deux, dans le tissu cellulaire sous-cutané; deux, dans le péritoine. Aucun des sujets d'expérience ne succombe.

(*d*) Le même jour, j'injecte un centimètre cube de la même culture, dans une des veines de l'oreille d'un lapin. Il meurt 21 heures après, avec une hypertrophie de la rate qui est noire, et une congestion du mésentère. Son sang cultive sur gélatine.

Le 14 novembre, deux lapins sont inoculés, à 5 heures du soir, par injection intra-veineuse, avec une deuxième culture dans le bouillon de poule. Ils meurent : l'un, au bout de 25 heures; l'autre, après 28 heures. Rates hypertrophiées.

§ VIII. — DES PARTICULARITÉS OBSERVÉES DANS LA TRANSMISSION ET LA MARCHE DE LA MALADIE EXPÉRIMENTALE OU SPONTANÉE. — ÉTIOLOGIE.

J'ai indiqué, § II, qu'à l'état spontané la dysenterie épizootique des poules et des dindes peut revêtir, dans une même basse-cour, et alors qu'elle bat son plein, chez certains sujets, une forme aiguë, amenant la mort en dix à douze jours, chez d'autres, une marche chronique, à échéance mortelle plus éloignée, et que, parfois enfin, elle peut se montrer bénigne et de courte durée.

Les mêmes irrégularités se reproduisent dans son étude expérimentale, sans que l'on puisse incriminer l'atténuation du bacille qui la cause.

Ainsi, tandis que dans les expériences II, IV, V et IX, § IV, les sujets inoculés dans le tissu conjonctif sous-cutané, avec le sang, la pulpe de la rate ou du foie des poules et dindes mortes de la maladie spontanée, se rétablissent après avoir été plus ou moins gravement malades, ceux des expériences I, VI, VII et VIII, § IV, inoculés dans les mêmes conditions et avec les mêmes produits, meurent rapidement (Exp. I, VI, VII), ou lentement. (Exp. VIII.)

D'autres expériences ont donné des résultats semblables, soit avec des cultures, soit avec des produits de poules mortes de la maladie expérimentale, sans qu'il soit encore possible d'admettre une atténuation du virus.

XXI. — Le 20 novembre, deux poules reçoivent, dans le tissu conjonctif sous-cutané, chacune un centimètre cube d'une culture dans du bouillon de poule. L'une meurt le 1er décembre; l'autre se rétablit après avoir été malade douze à quinze jours.

XXII. — Le 2 décembre, trois poules sont inoculées, sous la peau, avec un centimètre cube d'une culture dans du bouillon de poule, culture obtenue avec la rate de la poule ci-dessus, morte la veille. Deux meurent les 14 et 16 décembre, la troisième succombe le 27 seulement.

XXIII. — Le 14 décembre, deux poules sont inoculées, sous la peau, avec deux centimètres cubes de bouillon stérilisé dans lequel a été broyée la rate de la poule morte ce jour. L'une se rétablit après avoir été assez sérieusement malade; l'autre meurt à la période aiguë, le 28 décembre.

Ces faits négatifs ou à marche dissemblable, obtenus chez des oiseaux de même espèce, soumis à un même régime, avec des produits d'égale virulence et généralement riches en bacilles, indiquent donc d'abord qu'il existe chez la poule à l'état normal une faible réceptivité pour la maladie.

Mais il y a mieux.

L'affection, en effet, est toujours inoculée, et alors est presque toujours mortelle à bref délai, lorsqu'on fait ingérer à des poules des matières animales (intestin, foie, rate) provenant de sujets ayant succombé spontanément ou expérimentalement. C'est ce que montrent les expériences X, XI, XII, XIII, XIV auxquelles il faut ajouter les suivantes.

XXIV. — Le 1er décembre, une poule mange l'intestin d'une poule morte ce jour (Exp. XXI). Atteinte de diarrhée le 6, elle meurt le 13.

XXV. — Le 28 décembre, je donne à trois poules, en mélange dans de l'avoine, l'intestin, le foie, la rate, le cœur broyés d'une poule morte le matin (Exp. XXIII). Toutes trois sont atteintes de diarrhée le 2 janvier, et meurent : l'une, le 8 janvier ; une autre, le 10; la troisième, le 17.

Or, il est impossible de donner la maladie par l'ingestion de cultures pures, jeunes ou vieilles, quel que soit le milieu dans lequel elles ont poussé, données soit en boissons, soit mélangées aux grains constituant la nourriture ordinaire des volailles, comme il est impossible de la communiquer par cohabitation.

XXVI. — Cinq poules ont mangé ou bu, à différentes reprises, des cultures sur milieux solides ou dans des bouillons, et ont logé, pendant un mois, dans une niche où séjournaient des malades salissant de leur diarrhée la nourriture donnée intentionnellement par terre, sans que jamais aucune d'elles n'ait présenté la moindre indisposition. Cependant, elles n'étaient pas réfractaires, car toutes ont fourni des résultats positifs dans des expériences ultérieures.

Ces données, rapprochées de l'apparition saisonnière de la dysenterie, de sa localisation habituelle à une ferme même non isolée, de sa disparition brusque, spontanée, après avoir atteint une partie seulement de la population des poulaillers (§ II), et des formes plus ou moins graves ou rapides qu'elle peut affecter suivant les sujets, m'ont conduit à supposer l'existence d'une cause détruisant ou affaiblissant l'immunité naturelle des poules

et les rendant aptes à être contaminées, cause que l'expérience suivante a mise en relief.

XXVII. — Le 27 novembre, je donne à manger à trois des poules ayant servi à l'expérience XXVI, de la viande de lapin, hachée et imbibée de trente centimètres cubes d'une culture récente dans du bouillon de poule. Le 1er décembre, l'une d'elles est atteinte de diarrhée et meurt le 8. Le 3, les deux autres sont atteintes à leur tour : une succombe le 15 décembre; la troisième résiste.

Il a donc suffi, dans ce cas, d'un changement de régime, pour que la dysenterie évolue chez des sujets restés réfractaires, soit à la cohabitation, soit à l'ingestion d'aliments normaux souillés de matières virulentes; et ce fait, fort important quant à l'étiologie de la maladie spontanée, me paraît encore plus amplement démontré par les expériences ci-dessous qui, en faisant voir le peu de virulence du sang des sujets qui succombent et le profit que peut-être l'on pourrait retirer, dans le traitement préventif, de l'inoculation sous-cutanée de ce liquide aux poules encore saines de la basse-cour infectée, indiquent que la contamination s'effectue surtout et probablement exclusivement par la voie digestive.

Expériences. — Dans le cours de cette étude, douze poules reçurent, sous la peau, un, deux ou trois centimètres cubes de sang, dilué dans du bouillon stérilisé, et provenant de bêtes mortes de la dysenterie expérimentale ou spontanée. Toutes présentèrent les jours suivants un peu de tristesse, huit furent atteintes d'une diarrhée légère, du quatrième au sixième jour, mais aucune d'elles ne fut sérieusement malade. Réinoculées de nouveau, au bout d'un temps variable, avec des cultures très virulentes, elles résistèrent sans exception. Elles avaient donc été vaccinées.

Or, ce même liquide, donné en ingestion en quantité notable, a déterminé, deux fois sur cinq, des accidents mortels dans un court délai.

A l'aide de tout ce qui précède, il est facile maintenant d'établir *l'étiologie* de la dysenterie épizootique des poules et des dindes et d'expliquer son existence exclusive à l'époque des chaleurs, sa localisation à la ferme atteinte, sa disparition subite et la variété de ses manifestations.

Dans ma localité, pays de petite culture, l'élevage industriel des poules est encore presque complètement inconnu. Aussi, depuis l'époque où ils quittent leur mère, jusqu'au jour de leur engraissement qui se fait à l'épinette, ces oiseaux, logés étroi-

tement dans des poulaillers mal construits et malpropres, ne sont-ils l'objet d'aucuns soins spéciaux. Libres dès leur réveil, ne recevant pour la journée, et encore pas toujours, qu'une petite ration de grains distribuée au hasard, et obligés de pourvoir eux-mêmes à leur nourriture, ils grattent dans les fumiers qui servent le plus souvent de lieux d'enfouissement aux animaux de petite taille mourant à la ferme et aux enveloppes fœtales des femelles qui mettent bas, ou dans les cours, généralement mal entretenues et recouvertes de pailles en putréfaction mélangées à des déjections de toutes sortes, ou vagabondent et vont aux champs. N'ayant jamais enfin, à leur disposition, d'abreuvoirs alimentés d'eau propre, ils boivent l'eau des mares, des fossés, des ornières, ou les liquides excrémentitiels qui s'écoulent des fumiers et des étables.

Dans ces conditions, les poules, dont on connaît la voracité, l'avidité pour toutes les matières d'origine animale, sont plutôt carnivores que granivores, surtout si la fermière ne leur distribue pas ou leur distribue parcimonieusement la petite ration de grains qui leur est fournie tous les jours, et, sous l'influence de ce changement de régime, chez elles comme chez les autres animaux domestiques, il survient une modification de la réaction du contenu intestinal qui, d'ordinaire alcaline, devient neutre ou plus ou moins acidule suivant l'abondance et la nature des matières animales ingérées.

Par cette façon d'entendre l'élevage, la fermière, inconsciemment, développe donc chez ses poules une aptitude spéciale à contracter la dysenterie, aptitude peu prononcée, on l'a vu, quand la nourriture est normale.

Le terrain étant préparé pour recevoir la graine, avec la chaleur les pluies deviennent rares, les fossés se tarissent, les mares baissent, leur contenu se montre vaseux, nauséabond, peuplé de microorganismes, les liquides provenant des fumiers ou des étables fermentent activement, et les poules, forcées de s'abreuver de ces différents liquides, ingurgitent avec eux, très probablement, le bacille de la dysenterie qui exige, pour se développer, une certaine température.

La maladie apparaît alors et dure autant que persiste cette mauvaise hygiène et que l'état atmosphérique reste le même.

Mais que la chaleur baisse, que des pluies abondantes lavent

les cours, remplissent les mares et améliorent les boissons, ou que la fermière, voyant ses poules mourir, en prenne plus de soin et les nourrisse mieux, l'épizootie disparaît.

Sa localisation, dans la généralité des cas, à la ferme envahie, s'explique par les mêmes raisons. Dépendant en effet d'une question d'alimentation et d'hygiène et ne se transmettant pas par cohabitation, au moins chez les sujets soumis à un régime normal, il est clair que la dysenterie se confinera à l'exploitation atteinte, si les poules de la basse-cour voisine sont convenablement entretenues. Par contre, elle apparaîtra dans celle-ci, transmise, ou éclose sur place, si le régime y est défectueux.

Enfin, la rapidité de son évolution et sa gravité si différente suivant les sujets, sont la conséquence des influences qui la font naître. Exigeant pour se développer l'action d'une cause prédisposante spéciale, plus cette action sera intense chez un oiseau donné, plus faible sera la résistance opposée par l'organisme à l'envahissement microbien et plus vite les lésions évolueront.

§ IX. — DIAGNOSTIC.

Le diagnostic de cette dysenterie épizootique est facile.

Les *affections vermineuses* de l'intestin, très fréquentes chez la poule, graves, souvent enzootiques, et dont un des principaux symptômes est la diarrhée, s'en distinguent aisément par l'examen de ce produit, alors jaunâtre, fétide, et qui, au microscope, laisse voir de nombreux œufs révélant la présence des parasites.

Sa marche, tantôt aiguë, tantôt chronique; sa terminaison, souvent mortelle, mais parfois bénigne; sa durée, sa localisation habituelle à la ferme atteinte, et sa non-inoculabilité au lapin en injection sous-cutanée, la différencient suffisamment du *choléra des volailles*, sans qu'il soit besoin de recourir aux cultures.

Le *choléra des canards* ne peut être confondu avec elle, puisqu'il n'est pas inoculable aux poules.

La *maladie* observée par Petri chez des *oies*, des *canards* et des *poules*, en raison de la rapidité de son évolution, 12 à 20 heures, et de sa grande virulence pour le lapin, peut en être séparée aussi facilement.

Reste l'*entérite* de Klein[1] avec laquelle elle a un certain nombre

1. Je remercie ici M. Klein de l'envoi de son travail et de ses cultures.

de points communs que le tableau suivant met en relief, en même temps qu'il permet de porter le diagnostic différentiel.

ENTÉRITE DE KLEIN	DYSENTERIE ÉPIZOOTIQUE
Les poules seules sont atteintes.	Les poules et les *dindes* la contractent.
Elle est causée par un bacille abondant dans la rate, plus rare dans le sang, dont une goutte donne, à l'ensemencement sur plaques, de 50 à 200 colonies.	Elle est causée par un bacille abondant dans la rate, plus rare dans le sang, dont une goutte donne, à l'ensemencement sur plaques, de 20 *à* 30 *colonies*.
La diarrhée apparaît à la fin du 6e jour après l'inoculation, et les malades meurent du 7e au 8e.	La diarrhée apparaît vers le 4e *jour* après l'inoculation, et les malades meurent du 9e *au* 13e.
L'inoculation du sang est mortelle	L'inoculation du sang est *bénigne*.
La maladie, difficilement inoculable au lapin en injection sous cutanée, non virulente pour le pigeon, est transmise chez la poule par cohabitation.	La maladie *non virulente* pour le lapin et le cobaye en injection sous-cutanée, n'est pas transmise chez la poule par *cohabitation*.
Le bacille, à la fois aérobie et anaérobie, qui ne pousse pas sur pomme de terre, fournit sur gélatine, qu'il ne liquéfie pas, une culture ferme, blanche, mince, plate, à bords irréguliers.	Le bacille, à la fois aérobie et anaèrobie, qui ne pousse pas sur pomme de terre, fournit sur gélatine qu'il ne liquéfie pas, une culture *molle, grise, à bords réguliers, s'accroissant en épaisseur, puis coulant sur la surface de la gélatine pour s'amasser au fond du tube de culture où elle prend en vieillissant une légère teinte rougeâtre.*
Le bacille n'est pas tué après un séjour, à l'état humide, de 20° à 55°.	Le bacille *est tué* après un séjour, à l'état humide de 20° à 50°.
Les cultures ingérées avec les aliments ordinaires sont inoffensives.	Les cultures ingérées avec les aliments ordinaires sont inoffensives. *Elles sont virulentes mélangees à des matières animales et ainsi ingérées.*

§ X. — TRAITEMENT

La dysentérie épizootique des poules et des dindes étant la résultante d'un ensemble de causes dues à un régime défectueux, il est facile de la prévenir, ou, lorsqu'elle apparaît, d'en-

Karmanski del.

Imp. Lemercier & Cie Paris

rayer sa marche, à l'aide de simples moyens prophylactiques.

Elle sera prévenue par l'installation confortable d'une basse-cour éloignée des fumiers, limitant le parcours des volailles, mais vaste, munie d'abreuvoirs entretenus propres et approvisionnés d'eau de bonne qualité journellement renouvelée, et par la distribution d'aliments sains et appropriés.

Quand, pour une raison ou une autre, la création d'une basse-cour spéciale est impossible, une nourriture végétale, composée de grains, de son, de racines cuites ou crues, d'aliments herbacés hachés, de pâtées au pain, etc... donnée, en quantité suffisante, aux poules de la ferme et complétée par la mise à leur disposition d'une eau de boisson saine, outre qu'elle empêchera, chez ces volatiles, le vagabondage, la recherche des détritus de toute nature, tempérera les effets nuisibles des aliments de mauvaise qualité qui, entre les repas, pourront être ingurgités dans le grattage des fumiers et évitera tout danger d'infection intestinale.

Le changement de régime et les mêmes soins donnés aux poules d'une exploitation atteinte, combinés, lorsque la basse-cour est close, avec la désinfection des poulaillers, des abreuvoirs, du sol et l'isolement des malades, suffiront dans la majorité des cas à arrêter la marche envahissante de l'épizootie.

Si les poules ont un parcours libre, ces moyens de désinfection, plus difficiles à appliquer, devront néanmoins être employés dans la mesure du possible.

Si, alors, ces mesures ne suffisent pas, on devra tenter la vaccination des volailles encore saines, soit à l'aide de cultures atténuées (§ V), soit plus simplement par l'inoculation sous-cutanée d'une petite quantité du sang d'un sujet venant de succomber à la maladie ou sacrifié, et préalablement dilué dans un liquide stérilisé, bouillon ou eau distillée (§ VIII).

EXPLICATION DE LA PLANCHE VIII.

Fig. 1. — V. Veinules de myocarde. — FF, fibres musculaires plus ou moins altérées. — L, leucocytes.

Fig. 2. — C, capillaires de la muqueuse intestinale. — G, glandes.

Fig. 3. — Pulpe de la rate. — H, globules du sang. — E, éléments normaux de la rate. — M, bacilles.

Fig 4. — C, cellules du foie. — V, Veine entourée d'une zone E de leucocytes, et ayant des parois très épaissies. — V, veinule.

Grossissement commun : 60. Coloration par le carmin.

SUR LA QUESTION DE LA STRUCTURE DES BACTÉRIES

PAR M. LE Dr PROTOPOPOFF.

La question de la structure intime des bactéries est à l'ordre du jour, surtout depuis que Butschli [1] a démontré que non seulement les grandes espèces telles que *Chromatium Okenii*, *Ophidomonas Jenensis*, mais encore des espèces très petites, comme *Bacterium lineola*, *Spirochæte serpens*, *Beggiatoa alba*, comprennent une couche corticale et un corps central, l'un et l'autre de structure alvéolaire, et très distincts sur des préparations coloriées à l'hématoxyline.

D'après Zacharias [2], le corps central ne serait qu'un noyau. D'un autre côté, Ernst [3] a découvert, dans un grand nombre de micrococcus pathogènes et saprogènes, des petits corps variables de nombre, de grandeur et de disposition, et qu'il considère comme autant de noyaux. Klebs, au contraire, compare le protoplasma tout entier à la substance nucléaire, à raison de son affinité pour les matières colorantes. La question des noyaux n'est donc pas résolue et c'est ce qui me décide à publier mes recherches sur la structure de deux bactéries.

L'une a été trouvée sur une langue de vache portée en mars 1890 à l'Institut anatomo-pathologique de M. Chiari à Prague, et farcie dans toute son épaisseur de tubercules actinomyco-

1. BUTSCHLI, Sur la structure des bactéries; Leipzig, 1890; et Nouvelles contributions à la structure des protoplasmas, *Verhand. d. Naturhist.-Med. Vereins zu Heidelberg, N. F. IV.*

2. ZACHARIAS, Contribution à la connaissance des noyaux cellulaires et des cellules sexuelles, *Bot. Zeitung*, 1887, p. 367.

ERNST, Sur la formation du noyau et des spores dans les bactéries. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. V, p. 428.

tiques à tous les degrés de développement. Sur l'invitation de M. Chiari, j'en fis des cultures sur gélose, et je ne tardai pas à remarquer une bactérie dont une solution faible de fuchsine colore le protoplasma partie en rose pâle, partie en rouge foncé. Ces parties inégalement colorées forment des bandes régulières transverses au grand axe de la bactérie, et quelquefois nombreuses. La fig. *a* (Pl. VIII, au bas), en représente une présentant 13 de ces bandes : 7 colorées et 6 pâles.

Cet aspect singulier me fit craindre de suite une faute de préparation ou une influence du milieu de culture, que je m'attachai à varier le plus possible. La bactérie n'est pas cultivable sur pomme de terre. Sur la gélatine, le développement est lent, et il n'y a pas de liquéfaction. Le sérum sanguin, le bouillon faiblement alcalin et la gélose glycérinée à 2 0/0 sont les milieux les plus favorables. Or, partout, je retrouvai les mêmes phénomènes de coloration, mais ils varient avec l'âge de la culture, comme je vais l'exposer.

Au bout de 24 heures la bactérie est un petit bâtonnet ovale dont les deux pôles se colorent fortement, tandis qu'au centre on voit (Apochr. Zeiss, 1.40,2^{mm}) une bandelette mince à peine colorée. Quelques articles, deux ou trois fois plus longs que les autres, présentent la même structure. Après 72 heures, il y a encore, cela va sans dire, des bactéries de même aspect qu'après 24 heures; mais dans beaucoup on voit juxtaposées des bandes claires et des bandes foncées, comme on le voit dans la fig. *c*. Tout ceci se produit aussi bien sur gélose que dans du bouillon, et un nouvel ensemencement fait passer la bactérie par les mêmes phases. La fig. *d* représente une distribution encore plus régulière des bandes. Pour les bien voir, il faut employer une solution faible de fuchsine ou de bleu de méthylène. La safranine donne des résultats moins nets.

Il est clair que cette bactérie a une structure stratifiée, et il m'est permis de nommer *chromatine* la partie de son protoplasma qui se colore fortement, et *achromatine* celle qui reste pâle.

Dans des cultures plus anciennes, j'ai vu que certaines bandes de chromatine étaient plus foncées que d'autres, et aussi, sur les plus grands des articles, que la raie chromatique s'arrête à distance du contour de la bactérie, tantôt d'un côté et tantôt des deux à la fois. Au bout d'un certain temps, ces raies colorées parais-

sent se contracter, prennent la forme ronde d'un noyau, et se disposent le long de la bactérie en rangées de granulations régulières et plus ou moins égales.

La figure *e* représente l'aspect d'une culture sur gélose glycérinée, datant de 2 mois, et qui, après avoir passé par les phases que j'ai décrites, ne contenait que des bactéries se colorant en rose uniforme, avec rangées assez régulières de granulations nucléiformes fortement colorées. Seules, quelques-unes présentaient des vestiges de la structure primitive sous forme de lignes faiblement colorées. Ces granulations sont évidemment le résultat de la transformation des anciennes bandes de chromatine, et il est assez intéressant de remarquer que quelquefois (fig. *f* et *g*), la raie chromatique se segmente en son milieu, en deux corpuscules placés à côté l'un de l'autre.

Toutes ces formations correspondent précisément aux petits corps qu'Ernst a découverts à l'aide d'une double coloration, dans beaucoup de bactéries, et qu'il est porté à considérer comme analogues aux noyaux des cellules ordinaires. Il est certain que les réactions des matières colorantes plaident en faveur de cette opinion. Mais il ne faudrait pourtant pas assimiler ces corpuscules aux noyaux des éléments cellulaires ordinaires.

Les figures *g* et *h* représentent des bactéries, plus volumineuses que les autres et présentant, autant qu'on en peut juger, des formes d'involution. Ces formes anormales apparaissent dans tous les milieux de culture, et d'autant plus vite que la température est plus élevée.

La bactérie a une autre propriété qu'il est bon de signaler, c'est qu'elle ne s'étend guère en surface sur la gélose. Inoculée en un point limité, à l'aide du bout d'un fil de platine, elle donne des colonies rondes, s'élevant sous forme de bourrelets blancs ou blancs jaunâtres, à la façon de certaines levures. Une ligne tracée avec une pointe de platine à la surface de la gélose se dessine de même en un relief formé de colonies sèches, faiblement adhérentes, ne se laissant pourtant pas dissocier facilement dans l'eau, mais s'y répandant en petits nodules visibles à l'œil nu. La température optima est de 35°.

Dans le bouillon faiblement alcalin, ensemencé par la sur-

face, il se forme un voile mat qui s'étend peu à peu, et dans lequel on retrouve, à partir du troisième jour, des nodules nettement limités qui s'accroissent avec le temps et tombent au fond du vase. Ces nodules, tant ceux de la surface que ceux du fond, peuvent devenir très volumineux. Le bouillon reste toujours limpide. Quand on a fait l'ensemencement de façon à répartir la semence dans tout le liquide, c'est seulement sur le fond que le microbe se développe en petits amas.

II

J'ai retrouvé des aspects analogues à ceux que je viens de décrire sur l'*actinomyces* dont j'ai décrit, en collaboration avec le Dr Hammer, le développement sur la pomme de terre. Je voudrais compléter ici nos observations en y ajoutant ce qui se rapporte à la structure de la bactérie.

Une culture de ce champignon sur la pomme de terre, faite à l'étuve à 35°, nous a montré une production rapide de grains jaune-blanc ou grisâtres, qui, sur une culture âgée de 10 à 15 jours, se montrent formés de corpuscules ovales, tous de même grandeur, se colorant fortement dans une solution faible de fuchsine, et d'une petite quantité de filaments plus allongés, différant plus ou moins des filaments ensemencés. Il est facile de se convaincre que les corpuscules en question proviennent des filaments actinomycotiques par un ratatinement de la chromatine autour de certains centres, placés souvent à des distances égales l'une de l'autre, et donnant au filament l'aspect d'un streptococcus. On retrouve le même phénomène dans les grains d'*actinomyces* cultivés dans du bouillon, et Gasperini[1] a trouvé des aspects analogues dans les filaments du *Streptothrix Forsteri*.

D'un autre côté, ces filaments légèrement épaissis apparaissent comme formés d'une chaînette de corpuscules ovalaires de chromatine, séparés par des espaces plus clairs, comme on le voit dans les figures *j* et *i*. Sur certains filaments, les espaces

1. Gasperini Recherches morphologiques et biologiques sur le *Streptothrix Forsteri; Cohn, Ann. de microg.* : 1890. Les deux premiers dessins de l'auteur ressemblent beaucoup à ceux que nous avons présentés, M. Hammer et moi, à la Société des médecins, à Prague, au mois d'avril 1890.

clairs se réduisent ou disparaissent, de sorte que le filament semble composé d'une chaînette continue de corpuscules colorés. Il est clair qu'il se fait un processus de concentration autour des centres, et par là encore nos observations se rapprochent de celles de Gasperini.

Tous ces phénomènes se voient très bien sur une culture sur gélose glycérinée, ensemencée avec une émulsion d'une culture sur pomme de terre, faite dans du bouillon stérilisé, à la condition de n'ensemencer la gélose qu'après avoir laissé se déposer au fond de l'émulsion les parties les plus lourdes du mélange. La portion ensemencée ne contient alors que les corpuscules ovales dont nous avons parlé. La culture est très belle au bout de 3 à 4 jours.

J'ai aussi vu se produire, sur les filaments de l'*actinomyces* cultivés depuis 4 jours à 40°, une autre série de modifications bonnes à signaler. Sous l'influence de conditions encore mal déterminées, les corpuscules de chromatine, au lieu de se disposer parallèlement à la direction du filament, s'allongent perpendiculairement à cette direction, et lui donnent quelque chose de l'aspect d'une fibre musculaire striée, comme le montre les fig. *k* et *l*. Sur quelques-uns de ces filaments, on surprend le procès de segmentation, et deux bandes transverses de chromatine sont séparées par un espace clair plus étroit. Ernst a observé le même phénomène sur le *B. pseudosubtilis*, le *B. typhi abdominalis* et le *B. cyanogenus*, et le considérait comme un cas de segmentation transversale du noyau. J'incline pourtant à n'y voir qu'un cas de concentration irrégulière de la chromatine. Il arrive parfois que dans certains filaments on trouve à côté de l'achromatine colorée en rose pâle, et des corpuscules de chromatine teintés en rouge foncé, une partie du filament uniformément colorée en rouge foncé, avec des stries transverses régulières, tellement foncées qu'elles semblent presque noires. Il est probable que ce sont ces stries préformées qui servent de noyau de concentration à la chromatine.

J'ai eu l'honneur de présenter mes préparations à MM. Roux et Metchnikoff à Paris, et à M. Kuhne à Wiesbaden. Je remercie ici ces savants de l'intérêt qu'ils m'ont manifesté.

TRAITEMENT DU CHARBON PAR LE BICARBONATE DE SOUDE

D'APRÈS LA MÉTHODE DE M. FODOR

PAR M. LE Dr S. CHOR, D'ODESSA

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur).

Les diverses espèces et les divers individus d'une même espèce sont, comme on sait, très inégalement sensibles vis-à-vis des maladies infectieuses, et l'étude des causes de leurs degrés divers de sensibilité, et éventuellement de leur état réfractaire, a un grand intérêt, car elle promet de nous apprendre à donner artificiellement l'immunité. Parmi les tentatives faites pour expliquer l'immunité, nous ne nous occuperons ici que de celle qui invoque l'alcalinité du sang.

C'est M. Behring [1] qui lui a demandé le premier l'explication de l'état réfractaire des rats vis-à-vis du charbon. Cette alcalinité ne lui semble pas pouvoir être attribuée à la présence de bases minérales, telles que la potasse et la soude, mais plutôt à des bases organiques, de nature inconnue.

M. Fodor [2], qui étudie depuis longtemps les propriétés bactéricides du sang, a publié l'an dernier un travail dans lequel il envisage l'influence de divers facteurs d'ordre physique ou chimique, sur l'action bactéricide du sang pour le *bacillus anthracis*, et il conclut que cette action augmente avec l'alcalinité du sang, surtout quand cette alcalinité est produite par le bicarbonate de soude. Il se trouve ainsi tout naturellement conduit à essayer s'il ne pourrait pas donner à un animal l'immunité contre

1. *Centralbl f. klin Med.*, 1888, n° 38.
2. *Centralbl f. Bact.*, t. VII, n° 24.

le charbon au moyen du bicarbonate de soude. Voici un court résumé de ses expériences dans cette direction :

1° Deux lapins reçoivent dans l'estomac chacun 2 grammes de bicarbonate de soude et, une demi-heure après, une inoculation de 1/3 de c. c. de culture charbonneuse. On continue ensuite à leur introduire dans l'estomac, trois fois par jour, 2 grammes de bicarbonate. L'un de ces lapins succombe le 3e jour à un catarrhe intestinal, l'autre a survécu;

2° De deux lapins qui reçoivent dans l'estomac, trois fois par jour, 1 gramme de bicarbonate, l'un meurt après 3 jours de catarrhe intestinal, l'autre a survécu;

3° Cinq lapins reçoivent sous la peau des quantités variables de bicarbonate, de 0gr.25 à 1 gramme. Douze heures après, on leur inocule 0,5cc de culture de charbon, et on continue 6 fois par jour les injections sous-cutanées. Deux succombent avec d'immenses abcès au point d'injection; deux moururent le 4e et 5e jour. Celui qui avait reçu 0gr,25 de bicarbonate a survécu;

4° Quatre lapins reçoivent 0,5cc de culture charbonneuse, et 24 heures après on commence à leur injecter, trois fois par jour, 1 gramme de bicarbonate de soude. L'un de ces lapins mourut 7 jours après, les autres survécurent;

5° Trois lapins furent inoculés par un virus plus fort que le précédent. On commença les inoculations de bicarbonate trois jours après; tous ces lapins moururent beaucoup plus tard que les témoins:

6° Trois lapins, inoculés avec du charbon, furent traités cinq jours après par le bicarbonate de soude, et succombèrent bien après leurs témoins.

En résumant ces essais divers, on trouve que sur 19 lapins inoculés du charbon et traités par le bicarbonate de soude, trois succombèrent au charbon, 9 à une cause indéterminée (charbon douteux), et 7 survécurent. Les lapins témoins moururent plus vite que les lapins traités.

Ces résultats étaient tellement nouveaux et semblaient si probants, le remède était si simple, que le Dr Diatroptoff et moi nous entreprîmes de répéter ces expériences.

En août et septembre 1890, nous leur avons consacré, à la Station bactériologique d'Odessa, plus de 20 lapins auxquels on injectait une émulsion de bicarbonate de soude à 1/8, soit dans

l'estomac, soit sous la peau. Les uns avaient déjà subi, les autres subissaient ensuite une inoculation du second vaccin charbonneux, qui tue d'ordinaire tous nos lapins d'Odessa, à cause de leur petite taille (800 à 1,000 grammes). Enfin plusieurs de ces lapins recevaient du bicarbonate de soude sans subir l'injection charbonneuse, pendant que des témoins recevaient le charbon sans traitement au bicarbonate.

Tous ces lapins, sans exception, succombèrent, et ceux qui avaient reçu du bicarbonate avant les témoins. Tous avaient perdu de leur poids et présentaient une hyperémie des organes, notamment du foie et de la rate. On ne trouvait pas de bactéridies sur les préparations faites avec les lapins qui étaient morts très vite après les injections de bicarbonate de soude, et les ensemencements ne donnaient pas de culture. Cela fait croire que c'était le bicarbonate et non le charbon qui avait tué ces lapins. Par contre on trouvait des bactéridies et les ensemencements devenaient féconds avec les lapins qui avaient survécu plus longtemps aux injections. Enfin, ce qui appuie l'idée de l'effet nuisible du bicarbonate de soude, c'est la mort des lapins qui en avaient reçu sans être inoculés du charbon.

D'expériences faites pour étudier l'effet curatif possible de faibles doses de bicarbonate, il résulte que ces doses ne tuent plus le lapin sain, mais sont incapables d'arrêter le développement du charbon inoculé, et accélèrent plutôt ses effets morbides.

Enfin, pour savoir s'il y a quelques modifications chez les bactéridies inoculées à un animal préalablement alcalinisé, on a fait une émulsion avec la rate d'un lapin, inoculé du charbon après qu'il avait reçu des injections de bicarbonate de soude, et on a injecté cette émulsion à un autre lapin qui est mort dans les délais voulus. La virulence n'avait donc subi aucune diminution à la suite de l'alcalinisation de l'organisme.

Notre travail fut interrompu à Odessa par la maladie de l'un de nous. Je l'ai repris à Paris sur des lapins qui, en France, sont deux fois plus gros qu'à Odessa, et se montrent beaucoup moins sensibles au charbon.

Voici le compte rendu de mes expériences :

I. Le 10 janvier, trois lapins (A, 2,240 grammes; B, 1,990 grammes; C, témoin, 1,970 grammes) sont inoculés au moyen d'une culture charbonneuse asporogène dans du bouillon, et 5 heures après, on injecte à A et

à B 1 gramme de bicarbonate de soude dissous dans 8cc d'eau. A partir du lendemain, A et B reçoivent 3 fois par jour une injection pareille. — A meurt le 12 janvier à 2 heures, ayant perdu 360 grammes de son poids, et avec un fort œdème au point d'inoculation et des bactéridies dans tous les organes. L'ensemencement du sang sur gélose se montre fécond. — B meurt le 13 à 5 heures du soir, après avoir perdu 245 grammes; mêmes constatations que sur A. — Le lapin témoin succombe le même jour à 7 heures du soir.

II. Le 14 janvier, trois lapins (A, 2,085 grammes; B, 1975) reçoivent comme les précédents une injection de 1 gramme de bicarbonate de soude. Le lendemain, on leur inocule, ainsi qu'à un lapin témoin (C, 2,225 grammes) 0,5cc d'une culture charbonneuse asporogène. Dès lors, A et B reçoivent trois fois par jour une injection de 1 gramme de bicarbonate. — A succombe dans la nuit du 16 au 17 janvier, ayant perdu 255 grammes. Bactéridies dans les organes; ensemencements féconds. — B meurt le 17 janvier à 4 heures du soir, avec une augmentation de poids de 100 grammes. Très peu de bactéridies dans les organes et le sang; ensemencements féconds. — Le témoin mourut du charbon le 19 janvier, à 9 heures du matin, après avoir perdu 195 grammes.

III. Le 10 février, trois lapins (A, 1,720 grammes; B, 1,920 grammes; C, témoin, 1,790 grammes) reçoivent 0,5cc de culture charbonneuse. Six heures après, A et B reçoivent 1 gramme de bicarbonate de soude, et à partir du lendemain, trois fois par jour la même injection. — A et C meurent dans la nuit du 11 au 12 février, après avoir perdu respectivement 130 grammes et 60 grammes de leur poids. Dans les deux, bactéridies dans les organes et ensemencements féconds. Le 12 février, B reçoit encore 2 grammes de bicarbonate de soude, et le soir on lui retire 25cc de sang de l'artère crurale. Le lendemain, il ne reste plus trace de cette opération, mais le lapin meurt dans la nuit du 13 au 14 janvier. Nombreuses bactéridies dans les organes, ensemencement féconds.

IV. Le 19 février, à 4 heures et 8 heures du soir, on injecte à deux lapins (A, 2,075 grammes; B, 2,170 grammes) 1 gramme de bicarbonate de soude. Le matin du 20, on en injecte encore 1 gramme. Une heure après on leur inocule, ainsi qu'à un témoin (C, 2,045 grammes) 0,5cc de culture de charbon. A et B continuent ensuite à recevoir trois fois par jour 1 gramme de bicarbonate. — C succombe dans la nuit du 22 au 23, après avoir perdu 205 grammes. Peu de bactéridies dans les préparations. Ensemencements féconds. — A meurt le 22 à 4 heures du soir, après avoir perdu 275 grammes; bactéridies dans les organes et ensemencements féconds. — Le 22 au soir, on retire 25cc de sang de l'artère crurale de B qui succombe dans la nuit, peu de bactéridies dans les préparations; ensemencements féconds.

V. Le 24 février, trois lapins (A, 2,045 grammes; B, 2,045 grammes; C, témoin, 1,905 grammes) reçoivent 0,5cc de culture charbonneuse. Dès le

matin du 25, on commence sur A et B les injections de bicarbonate. Mais A meurt une heure après; on traite alors le témoin, — B meurt à 3 heures; C succombe le 26 à 2 heures du soir. Beaucoup de bactéridies sur les préparations des deux premiers lapins, peu sur celles de C; ensemencements féconds partout.

Comme le virus asporogène s'était évidemment renforcé, j'ai poursuivi mes expériences avec le 2e vaccin.

VI. Trois lapins (A, 1,870 grammes; B, 1,800 grammes; C, témoin, 1495 grammes) reçoivent 1cc de culture du second vaccin, ensemencée la veille au soir, et peu abondante. Sept heures après l'inoculation, A et B reçoivent 1 gramme de bicarbonate, et trois nouvelles doses le 28 février et une le 1er mars. — A meurt le 1er mars à 11 heures du matin, après avoir perdu 145 grammes, et avec de nombreuses bactéridies dans les organes; B continue à recevoir le 1er et le 2 mars ses trois injections. Il succombe le 3 mars, à 2 heures du soir, avec une perte de poids de 190 grammes. — Le témoin meurt le 2 mars à 2 heures du soir, avec une perte de poids de 165 grammes. Dans les deux cas, bactéridies dans les organes. Les ensemencements ont été troublés par une impureté accidentelle.

VII. Le 3 mars, on retire, pour en étudier l'alcalinité, 25cc de sang de l'artère crurale de deux lapins qui, trois semaines avant, avaient reçu pendant trois jours trois injections par jour de 1 gramme de bicarbonate. — Le lapin A se rétablit complètement et passe de 2,130 grammes à 2,300 grammes. L'autre, B, conserve une plaie au point d'inoculation, et tombe de 2,170 grammes à 1,740 grammes. On inocule 0,5cc du second vaccin à A et à B, en même temps qu'à un témoin C (1,920 grammes). Cinq heures après; on injecte A et B avec 1 gramme de bicarbonate. Le 4 et le 5, trois injections par jour. Le 6 mars, deux seulement. Tous ces lapins sont restés bien portants.

En faisant le récolement de ces expériences, on voit que :

Sur quatre expériences (I, III, V, VI), portant chacune sur trois lapins, où le traitement a suivi l'inoculation charbonneuse, les témoins sont morts une fois avant les lapins traités, une autre fois en même temps que l'un d'eux et avant le second, une autre fois après le dernier des lapins traités.

Sur deux expériences (II et IV) portant chacune sur trois lapins, où le traitement a précédé l'inoculation virulente, un témoin est mort avant les lapins traités, et le second après eux.

Ainsi le résultat a été aussi négatif qu'à Odessa[1]. Cette contradiction absolue avec les résultats de Fodor semble difficilement

1. Depuis la rédaction de ce travail, j'ai reçu un article de M. Behring (*Zeitschr. f. Hyg.*, 1890, p. 463), où se savant annonce brièvement n'avoir pas non plus retrouvé les résultats de M. Fodor, en recommençant ses expériences.

explicable. Pourtant, en y regardant de près, on voit que ce savant n'a pas ensemencé une seule fois le sang ni les organes des animaux morts. Cela eût pourtant éclairé, sans aucun doute, à la fois les causes de la mort chez les 9 lapins donnés comme ayant succombé à des causes indéterminées, et les causes de la guérison de ceux qui ont résisté. Comme M. Fodor signale, chez deux des animaux morts, des abcès volumineux au point d'inoculation, on peut se demander s'il n'a pas inoculé, en même temps que le bicarbonate de soude, des microbes étrangers ayant amené dans quelques cas des désordres mortels, et dans d'autres ayant produit des actions thérapeutiques. Pour m'éclairer à ce sujet, je fais l'expérience suivante.

Le 6 janvier, j'ai inoculé à 3 lapins A, B et C, 0,5^{cc} de culture charbonneuse. Cinq heures après, A et B ont reçu 1 gramme de bicarbonate de soude, en suspension dans 8^{cc} d'eau non stérilisée [1]. Le 7 et le 8, ils ont reçu chaque jour trois injections nouvelles. — A succombe le 8 au soir, avec très peu de bactéridies dans le sang et les organes, mais on y voit, avec un fort grossissement, de petits microbes semblables à ceux de la septicémie des lapins. — B succombe dans la nuit du 9 au 10 janvier; pas de bactéridies dans les préparations, mais les ensemencements, au lieu de donner, comme dans les expériences ci-dessus, des cultures pures du bacille charbonneux, fournissent des cultures presque pures de la bactérie étrangère. — Le témoin succombe, dans la nuit du 8 janvier, à une affection charbonneuse certaine.

Restait maintenant à se demander si l'alcalinité du sang était vraiment augmentée par l'addition du bicarbonate de soude. Pour le savoir, j'ai fait quelques expériences préliminaires avec le sérum de bœuf, que je saturais, en prenant comme indicateur le phtaléine du phénol, au moyen d'une solution étendue d'acide sulfurique, titrée au moyen d'une liqueur contenant 8^{gr},30 par litre de carbonate de soude. Sur deux échantillons de sérum conservés au laboratoire en vases clos, j'ai trouvé que l'alcalinité était représentée dans un cas par 0^{gr},00238, dans l'autre par 0^{gr},00228 de carbonate de soude fondu pour 10^{cc} de sérum.

1. Il est utile de dire qu'une partie du bicarbonate de soude reste à l'état de suspension quand on l'introduit dans 8^{cc} d'eau, même chauffée à 30°. Il faut ce garder de secouer ce liquide, de peur d'obstruer la seringue.

Pour prélever du sang de l'artère crurale des lapins, j'y introduisais directement un tube effilé stérilisé. On peut retirer de cette façon de 40 à 50^{cc} de sang pur et stérile.

Le 29 janvier, je prends ainsi, sur un lapin, du sang que je répartis en deux tubes qui, le lendemain, me donnent l'un du sérum bien limpide, l'autre du sérum un peu rougeâtre. Le premier présente un titre de 0^{gr},00204 évalué comme précédemment. Le lendemain, l'autre me donne 0^{gr}.00194.

Le 31 janvier, on fait, sur un autre lapin, une prise de sang, qu'on enferme dans un tube hermétiquement clos, et qui, étudié le 3 février, me donne de même 0^{gr},00214 pour un premier essai, et 0^{gr}.00204 pour un second. Le 4 février, on trouve 0^{gr},00208.

Le 4 février, on fait une prise sur un lapin qui avait reçu depuis 3 jours trois injections par jour de 1 gramme de bicarbonate de soude. L'alcalinité de son sérum équivalait dans divers essais à 0^{gr},00250,-0^{gr},00280 de carbonate de soude.

Le 6 février, un autre lapin, traité comme le précédent, a donné des chiffres de 0^{gr},00258 à 0^{gr},00266.

On voit donc que l'alcalinité du sang augmente sensiblement à la suite d'injections sous-cutanées de bicarbonate.

Pour étudier l'influence de ce bicarbonate sur des lapins inoculés par le charbon, j'ai fait les expériences suivantes :

Le 10 février, on inocule le charbon à un lapin. Six heures après, on lui injecte 1 gramme de bicarbonate de soude, et le lendemain et le surlendemain il subit trois injections nouvelles par jour. Le 12 au soir, on lui retire du sang dont l'alcalinité était de 0^{gr},00236,-0^{gr},00242.

Le 22 février, on prend du sang d'un lapin inoculé le 20, et sur lequel on avait commencé le 19 les injections de bicarbonate. L'alcalinité était de 0^{gr},00228,-0^{gr},00236.

Ainsi, l'alcalinité semble moindre, dans ces lapins inoculés que dans des lapins non inoculés, ce qu'il faut attribuer à l'infection aiguë qui, comme on sait, diminue l'alcalinité du sang.

On peut donc conclure de tous ces faits que l'augmentation non douteuse de l'alcalinité du sang par l'introduction du bicarbonate de soude dans l'organisme n'a, contrairement à l'assertion de M. Fodor, aucune influence thérapeutique sur la maladie charbonneuse.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1890

Par M. Léon PERDRIX.

Pendant l'année 1890, 1,546 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur.

Sur ce nombre, il y a eu 314 étrangers dont voici le détail par nationalité :

Angleterre	56	Hollande	17
Irlande	21	Indes Néerlandaises	2
Indes anglaises	4	Hongrie	8
Allemagne	1	Italie	1
Belgique	101	Monaco	2
Brésil	2	Portugal	67
Égypte	2	Roumanie	1
Espagne	4	Russie	2
États-Unis	3	Turquie d'Asie	1
Grèce	19		

Parmi les 1,546 personnes traitées, 11 sont mortes de rage après la fin des inoculations. La mortalité totale a donc été de 0,71 0/0. Mais sur les 11 personnes mortes de rage après la fin des inoculations, 5 ont succombé plus de 15 jours après la fin du traitement et 6 dans les 15 jours qui l'ont suivi[1].

Pour juger de l'efficacité de la vaccination, il y a lieu de ne faire entrer en ligne de compte que les 5 morts, parce que d'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage

1. On trouvera, dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, les noms des personnes décédées, ainsi que les circonstances de leurs morsures et de leur maladie.

dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahis par le virus rabique pendant le traitement lui-même. Celui-ci n'ayant pu être achevé n'a pas eu toute son efficacité. Nous avons déjà fait observer dans les statistiques antérieures que les chiens inoculés après trépanation, sous la dure-mère, avec le virus de la rage des rues, mettent 14 à 18 jours à prendre la maladie.

Cinq personnes seulement ayant été prises de rage plus de 15 jours après le traitement, on doit établir que les résultats pour l'année 1890, au lieu de se chiffrer par une mortalité de 0,71 0/0, sont en réalité les suivants :

Personnes traitées	1,540[1]
Mortes	5
Mortalité	0,32 0/0

On voit que la proportion des morts après le traitement est toujours très faible.

Voici, en effet, les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉES	PERSONNES TRAITÉES	MORTS	MORTALITÉ
1886	2.671	25	0.94 %
1887	1.770	13	0,73
1888	1.622	9	0,55
1889	1.830	6	0,33
1890	1.540	5	0,32
	9.433	58	0,61

SIÈGE DES MORSURES.

Au point de vue de leur siège, nous divisons les morsures en trois classes :

Morsures à la tête et au visage;
Morsures aux mains;
Morsures aux membres et au tronc.

Nous rappellerons d'abord que les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories, qui forment chacune un tableau.

1. Ce chiffre est différent du nombre 1,546, indiqué plus haut. Comme nous ne comptons pas dans la mortalité les personnes prises de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement, nous devons aussi, pour être rigoureux, les retrancher du nombre des personnes traitées.

1° Tableau A. Personnes pour lesquelles la rage de l'animal mordeur est expérimentalement démontrée par le développement de la rage chez un animal inoculé, ou mordu en même temps que la personne traitée.

2° Tableau B. Personnes pour lesquelles la rage de l'animal mordeur est constatée par examen vétérinaire.

3° Tableau C. Personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Voici les résultats détaillés pour l'année 1890.

	Morsures à la tête et au visage			Morsures aux mains			Morsures aux membres et aux tronc			Total		
	personnes traitées	morts	mortalité	traitées	morts	mortalité	traitées	morts	mortalité	traitées	morts	mortalité
Tableau A.....	32	0	0	260	0	0	124	0	0	416	0	0
Tableau B.....	76	1	1,3	514	3	0,58	319	0	0	909	4	0,44
Tableau C.....	9	0	0	104	1	0,96	102	0	0	215	1	0,46
Totaux	117	1	0,85	878	4	0,45	545	0	0	1.540	5	0,32

Le degré de gravité des morsures se manifeste par la comparaison des chiffres précédents.

La mortalité est en effet :

0,85 pour les morsures à la tête.
0,45 pour les morsures aux mains.
0 pour les morsures aux membres et au tronc.

La statistique générale, depuis l'origine des vaccinations jusqu'au 31 décembre 1890, donne des résultats de même ordre, ainsi que le montre le tableau ci-dessous : le fait est plus sensible parce que les nombres sont plus élevés.

	Personnes traitées	Morts	Mortalité
Morsures à la tête et au visage..	789	16	2.02
Morsures aux mains.....	5.265	33	0.62
Aux membres et au tronc.....	3.379	9	0.26
Totaux généraux.....	9.433	58	0.61

DISTRIBUTION DES CAS DE MORSURES PAR DÉPARTEMENTS.

La distribution des cas de morsures par départements est un peu différente de celle qui a été signalée pour les années précédentes.

Dans la Seine, il y a une décroissance marquée; le nombre des personnes qui se sont présentées aux inoculations est en effet :

En 1888 : 450
En 1889 : 262
En 1890 : 113 [1]

La rage est également en diminution dans plusieurs départements, principalement dans le Finistère, le Morbihan et les Côtes-du-Nord.

Par contre, il y a eu de véritables épidémies dans d'autres régions; au premier rang se place le département du Rhône, où les cas de rage sont toujours très nombreux.

Il y a une augmentation très marquée dans les Alpes-Maritimes et le Var; il en est de même pour les Basses-Pyrénées, le Tarn et le Lot-et-Garonne.

L'Algérie, et en particulier les départements d'Alger et d'Oran, fournissent toujours un fort contingent de personnes mordues.

Le tableau suivant indique le nombre des personnes traitées dans chacun de ces départements, pendant les quatre dernières années.

	NOMBRE DES PERSONNES TRAITÉES			
	1887	1888	1889	1890
Rhône	43	48	96	92
Alpes-Maritimes	13	0	1	40
Var	1	2	3	19
Basses-Pyrénées	32	40	20	67
Tarn	5	5	14	18
Lot-et-Garonne	26	18	14	30
Alger	»	50	62	89
Oran	»	52	74	95
Constantine	»	41	41	27

1. La Préfecture de police, par l'organe de M. le docteur Dujardin-Beaumetz, publie chaque année la statistique des personnes mordues dans le département de la Seine par des chiens enragés et qui ont subi le traitement antirabique. Pour l'année 1890, cette statistique s'applique à 95 personnes. En réalité, 113 personnes se sont présentées aux inoculations, mais 95 seulement ont subi le traitement complet.

Nous donnons ci-dessous, par départements de France et d'Algérie, le nombre de personnes mordues qui se sont présentées à l'Institut Pasteur, pendant les années 1888, 1889, 1890.

	1888	1889	1890	TOTAL		1888	1889	1890	TOTAL
Ain	9	17	14	40	Lot-et-Garonne	18	14	30	62
Aisne	3	5	8	16	Lozère	3	9	1	13
Allier	7	6	9	22	Maine-et-Loire	2	3	1	6
Alpes (Basses-)	1	3	0	4	Manche	1	9	9	19
Alpes (Hautes-)	1	1	2	4	Marne	6	1	1	8
Alpes-Maritimes	0	1	40	41	Marne (Haute-)	4	2	7	13
Ardèche	22	18	11	51	Mayenne	0	0	1	1
Ardennes	0	7	0	7	Meurthe-et-Moselle	5	25	6	36
Ariège	3	1	2	6	Meuse	5	1	6	12
Aube	3	0	0	3	Morbihan	24	24	2	50
Aude	16	21	9	46	Nièvre	4	3	0	7
Aveyron	5	17	14	36	Nord	9	26	13	48
Bouches-du-Rhône	90	29	40	159	Oise	24	16	11	51
Calvados	0	2	0	2	Orne	2	1	0	3
Cantal	13	12	13	38	Pas-de-Calais	9	12	4	25
Charente	2	4	15	21	Puy-de-Dôme	21	13	6	40
Charente-Inférieure	3	12	9	24	Pyrénées (Basses)	40	20	67	127
Cher	6	1	0	7	Pyrénées (Hautes)	18	25	7	50
Corrèze	6	4	7	17	Pyrénées-Orientales	17	15	8	40
Corse	2	1	0	3	Rhin (Haut-)	0	0	0	0
Côte-d'Or	3	6	11	20	Rhône	48	96	92	236
Côtes-du-Nord	21	12	0	33	Saône (Haute-)	1	5	1	7
Creuse	3	4	5	12	Saône-et-Loire	11	14	11	36
Dordogne	12	10	11	33	Sarthe	2	0	0	2
Doubs	3	1	11	15	Savoie	19	15	14	48
Drôme	20	18	31	69	Savoie (Haute-)	11	22	1	34
Eure	8	8	0	16	Seine	450	262	113	825
Eure-et-Loir	1	2	0	3	Seine-et-Marne	14	6	2	22
Finistère	18	16	6	40	Seine-et-Oise	59	55	37	151
Gard	38	24	27	89	Seine-Inférieure	22	31	10	63
Garonne (Haute-)	8	39	14	61	Sèvres (Deux-)	1	3	0	4
Gers	11	15	16	42	Somme	8	4	9	21
Gironde	30	22	34	86	Tarn	5	14	18	37
Hérault	30	33	25	88	Tarn-et-Garonne	11	13	15	39
Ille-et-Vilaine	14	10	11	35	Var	2	3	19	24
Indre	1	1	4	6	Vaucluse	8	21	15	44
Indre-et-Loire	5	1	7	13	Vendée	3	0	0	3
Isère	33	59	17	109	Vienne	0	1	0	1
Jura	3	3	9	15	Vienne (Haute-)	7	5	3	15
Landes	11	14	19	44	Vosges	3	7	9	19
Loir-et-Cher	0	1	1	2	Yonne	1	1	2	4
Loire (Haute-)	6	5	0	11	Alger	50	62	89	201
Loire	24	52	21	97	Oran	52	74	95	221
Loire-Inférieure	4	11	2	17	Constantine	41	41	27	109
Loiret	16	11	2	29	Tunisie	9	5	23	37
Lot	6	29	10	45					

REVUES ET ANALYSES

M. Nencki. — Les acides lactiques isomères comme moyen de reconnaître certaines espèces microbiennes, *Centralbl. f. Bact.*, t. IX, p. 304.

De quelque côté qu'on étudie les microbes, ils sollicitent et retiennent l'attention. Voici un nouvel exemple de leur intervention dans les questions de pouvoir rotatoire moléculaire. M. Nencki et N. Sieber avaient déjà signalé la présence, dans les tumeurs des cobayes infectés par le charbon symptomatique, d'un micrococcus facultativement anaérobie, qui fait fermenter le sucre et fournit non pas l'acide lactique inactif, mais l'acide lactique droit qu'on rencontre dans les muscles et qu'on appelle acide paralactique. Ce microbe avait été appelé *micrococcus acidi paralactici*. Depuis, on avait signalé plusieurs champignons à segmentation transverse donnant aussi le même acide paralactique.

Plus récemment, le Dr *Schardinger* a trouvé dans une eau un autre ferment lactique donnant un acide doué de toutes les propriétés de l'acide paralactique, donnant comme lui un sel de zinc cristallisant avec deux molécules d'eau, un sel de calcium avec quatre molécules et demie ; mais, tandis que l'acide paralactique fait tourner à droite le plan de polarisation à l'état anhydre, et à gauche à l'état de sel, c'est l'inverse pour l'acide du Dr Schardinger, qui a par suite reçu le nom d'acide lactique gauche. En mélangeant des poids moléculaires égaux du nouveau lactate de zinc et du paralactate de zinc de l'acide des muscles, on obtient un lactate de zinc inactif, cristallisant avec 3 molécules d'eau, et identique par conséquent avec celui qu'on prépare au moyen de l'acide lactique de fermentation. C'est là, comme on voit, une répétition des phénomènes déjà observés avec l'acide tartrique, et ailleurs. Ils sont dus à la présence d'un atome de carbone asymétrique dans l'acide éthylidène-lactique. Mais il y a ceci en plus, c'est qu'ici

1. *Wiener Akademieberichte, Monatshefte f. Chemie*, t. X, 1889.
2. *Id.*, Séance du 4 décembre 1890.

nous pouvons préparer à volonté l'acide lactique droit ou gauche, avec un sucre qui est droit. Il sera intéressant de chercher quelle influence peut exercer sur le phénomène le pouvoir rotatoire du sucre originaire.

Au point de vue pratique, voilà une obligation nouvelle pour tous ceux qui étudient la chimie des fermentations. Lorsqu'ils rencontreront de l'acide lactique, il faudra qu'ils recherchent si c'est l'acide droit, gauche, ou inactif. Par exemple M. Nencki et N. Sieber avaient signalé, dans le travail cité plus haut, la présence dans l'intestin grêle d'un bacille très semblable au *bacterium coli commune*, qui a sans doute été souvent confondu avec lui, mais qui pourtant est différent, car en le soumettant à une étude plus approfondie, le Dr Bischler a vu qu'il donnait avec le sucre de l'acide lactique inactif, tandis que le *bact. coli commune* donne de l'acide paralactique; et ce n'est pas là chez eux une propriété variable et transitoire, car ils la portent dans toutes les cultures, même impures, dont ils font partie.

On retrouve là un nouvel exemple de cette notion, sortie des premiers travaux de M. Pasteur, que ce sont les propriétés biologiques, et non la morphologie, qui peuvent servir à différencier les microbes. C'est pour cela que ces *Annales* se sont jusqu'ici refusées à toute classification prématurée. Chaque année de travail fond ensemble des espèces qu'on croyait distinctes, et en sépare d'autres qu'on croyait identiques.

En présence de ces nécessités d'ordre chimique qui surgissent, il ne sera pas inutile de dire comment on s'y prend en général pour étudier les produits de fermentation, dans le laboratoire de M. Nencki, dont la réputation est faite dans ce genre de recherches.

Dans un litre de bouillon de veau ou d'une solution à 10 0/0 de peptone Chapoteaut, on dissout 50 à 80 grammes de sucre, de glycérine, ou de l'alcool polyatomique à étudier; on ajoute de 20 à 30 grammes de carbonate de chaux faiblement calciné; on stérilise à l'autoclave à 115°, et suivant les cas, on ferme soit avec un tampon de ouate, soit avec un bouchon à deux trous, portant deux tubes par lesquels on fait passer avant l'ensemencement un courant d'acide carbonique. Quand la fermentation est terminée, ce qui exige toujours un temps plus long à l'abri qu'au contact de l'air, on titre le sucre restant, on décante ou on filtre la culture. Le dépôt n'est d'ordinaire formé que de carbonate de chaux, mais, comme il pourrait contenir aussi du succinate de chaux, on le dissout dans un léger excès d'acide chlorhydrique et on l'épuise par un mélange de 2 d'éther et 1 d'alcool.

Le liquide filtré est précipité par l'acide oxalique, filtré et distillé, e qui sépare l'alcool et les acides volatils. En saturant par la potasse

le liquide distillé, et en distillant à nouveau, on isole l'alcool ou les alcools. Les acides volatils restent à l'état de sels dans la cornue.

Quant au résidu de la première distillation, qui contient les acides fixes, on l'évapore à consistance sirupeuse, et on l'épuise par l'éther, qui dissout l'acide oxalique ajouté en excès, l'acide lactique, et éventuellement l'acide succinique. En évaporant l'éther, on obtient un résidu sirupeux qu'on décolore en le faisant bouillir avec de l'eau et un peu de noir animal, et qu'on soumet alors à une étude polarimétrique. En faisant bouillir avec de l'oxyde de zinc, on sépare l'acide oxalique à l'état d'oxalate de zinc qui reste insoluble. Le succinate de zinc, très peu soluble, se sépare facilement du lactate de zinc, très soluble; il suffit d'évaporer à siccité, et de reprendre le résidu cristallisé par un peu d'eau chaude qui laisse le succinate de zinc. Le lactate de zinc est alors facile à étudier. Si la solution éthérée s'est montrée active au polarimètre, il faut s'attendre à trouver le sel de zinc avec 12,9 0/0 d'eau de cristallisation. Mais pour plus de sûreté, il faut étudier le sel de zinc au polarimètre.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées mortes de rage.

Binet Auguste, 75 ans, demeurant à Méaulte (Somme). — Mordu le 5 décembre 1890 par un chien reconnu enragé à l'autopsie par M. Lemaire, vétérinaire à Albert.

Binet présente une morsure par piqûre peu profonde, ayant saigné, sur la première phalange de l'index droit. Cette blessure n'a pas été cautérisée.

Son traitement a commencé seulement le 13 décembre (8 jours après l'accident); il a été terminé le 27 décembre.

Le 8 avril, Binet tombe malade; il a de l'hydrophobie, du délire, des hallucinations, de la photophobie. Les phénomènes s'accentuent de jour en jour et la mort survient le 15 avril. (Rapport de M. le Dr De le Vallé, à Albert.)

Binet fait partie de la statistique de 1890; il est compris dans le nombre de morts indiqué dans cette statistique.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — AVRIL 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	»	1	»	5	7	»	»	»
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	1	»	»	2		»	»	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	3	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	4	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	9	17	»	24	54	»	3	14
Morsures aux mains — multiples	»	8			30		»	11	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	23	»	»	10	»	»
Pas de cautérisation	11	»	»	30	»	»	3	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	2	3	»	12	30	»	1	12
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	1		»	18		»	11	
Cautérisations efficaces	1	»	»	1	»	»	2	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	19	»	»	9	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	10	»	»	1	»	»
Habits déchirés	3	»	»	28	»	»	12	»	»
Morsures à nu	»	»	»	2	»	»	»	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	5	5		3	3
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	3	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Habits déchirés	»	»	»	4	»	»	2	»	»
Morsures à nu	»	»	»	5	»	»	3	»	»
Totaux. **Français et Algériens**		20	21		88	96		25	29
Totaux. **Etrangers**		1			8			4	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					146				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 135 fois; chats, 7 fois; cheval, 2 fois; âne, 1 fois; vaches, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. JUIN 1891. N° 6.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SUR UNE MALADIE PARASITAIRE DE L'HOMME
TRANSMISSIBLE AU LAPIN

PAR MM.

DU CAZAL,
médecin principal de 2e classe,
professeur au Val-de-Grâce.

ET

VAILLARD,
médecin-major de 1re classe, professeur
agrégé du Val-de-Grâce.

Au mois de mai 1890 a succombé, dans le service de l'un de nous, un malade atteint d'une affection aussi singulière par ses symptômes et son évolution que par la nature et la localisation des lésions qui la caractérisaient; au foyer de celles-ci existait, à l'état de pureté, un bacille spécial dont les cultures, inoculées au lapin, ont déterminé sur cet animal la reproduction à peu près exacte des altérations observées chez l'homme. Cette affection, de cause microbienne, ne paraissant correspondre à aucune des maladies actuellement décrites en pathologie humaine, nous avons cru utile d'en donner mention.

Nous relaterons d'abord l'observation clinique et les détails de l'autopsie, puis les recherches bactériologiques et expérimentales auquelles le fait a donné lieu.

M. P..., âgé de 33 ans, médecin de 2e classe de la marine, entre à l'hôpital du Val-de-Grâce le 28 avril 1890.

C'est un homme exceptionnellement fort et vigoureux; il est très gras et présente en même temps des masses musculaires herculéennes.

M. P... a eu, étant aux colonies, il y a plusieurs années, une dysenterie qui a plusieurs fois récidivé.

Il se plaint de souffrir depuis longtemps d'une dilatation de l'estomac

qui a été, dans ces derniers temps, très améliorée par des prises de naphtol.

Le malade s'est senti plus souffrant vendredi 25 avril; il a pris le lit le 26. Le 29, se sentant plus mal, il a fait prier un de ses collègues de venir le voir; celui-ci, trouvant son état assez alarmant, demande son admission immédiate à l'hôpital du Val-de-Grâce.

Nous voyons M. P..., pour la première fois, ce même jour, à trois heures. Il est très agité, ne pouvant trouver dans son lit aucune position satisfaisante, et nous dit n'avoir pu dormir depuis deux jours. Son œil est brillant; son pouls plein et large. Sa langue est blanche, sans rougeur sur les bords. Pas de céphalalgie proprement dite, mais cependant le malade dit que sa tête est lourde. Temp. axillaire : 38°, 3.

Les viscères abdominaux paraissent avoir leurs dimensions normales : pas d'apparence de dilatation stomacale.

A la palpation le ventre ne présente qu'un peu de sensibilité sans localisation précise; il y a un peu de diarrhée depuis deux jours, et le malade se plaint très vivement de tranchées extrêmement violentes et douloureuses.

L'auscultation ne révèle rien dans les poumons; le malade ne tousse pas et n'a jamais toussé. Aucun trouble apparent du côté du cœur.

Le lendemain matin (29 avril) le malade se sent mieux. Temp. : 38° 4. La langue est toujours blanche et épaisse; la bouche extrêmement sèche. Un ipéca administré la veille n'a pas provoqué de vomissements, mais a déterminé une diarrhée abondante qui persiste encore. Le ventre est modérément ballonné et un peu sensible dans toute son étendue. Insomnie et agitation très grande.

Température du soir : 37° 8.

30 *avril*. Le malade se plaint de n'avoir pas fermé l'œil de la nuit, qu'il a passée dans une agitation extrême. La bouche et la langue sont sèches, la soif extrêmement vive. La diarrhée persiste; trois garde-robes pendant la nuit.

La miction devient difficile et même un peu douloureuse.

Le ventre n'est pas plus ballonné que la veille, mais il est plus sensible; cette sensibilité, tout en étant générale, est cependant plus vive au niveau du fond de la vessie; elle l'est au contraire beaucoup moins au niveau des fosses iliaques et du creux épigastrique.

Temp. Matin : 38° 1. Soir : 39° 3.

Dans la soirée, l'état est sensiblement le même; le 1er mai, à la visite du matin, le mal a fait depuis la veille des progrès effrayants. L'aspect du malade est celui d'un cholérique à la période algide ou d'un homme succombant à un empoisonnement : après avoir subdéliré pendant la nuit, il est aphone, la face est couverte de sueurs visqueuses, les yeux sont enfoncés dans les orbites qui ont pris une couleur bistre foncée; les mains sont glacées; le pouls absolument imperceptible.

Le ventre est extrêmement ballonné, douloureux et sensible dans toute son étendue comme la veille; mais, plus que la veille encore, cette sensibilité est beaucoup plus vive quand la pression porte au niveau du fond de la vessie.

Temp. Matin : 39° 3. Soir : 39° 6.

Vers cinq heures du soir, le malade succombe presque subitement.

Autopsie, faite le 3 mai, 36 heures après la mort.

Thorax. — Les organes thoraciques ne présentent aucune altération.

Abdomen. — La paroi abdominale est tapissée d'une couche adipeuse sous-cutanée de trois centimètres d'épaisseur; l'épiploon est également surchargé de graisse.

Sur toute l'étendue du péritoine pariétal sont disséminés des nodules blancs jaunâtres, arrondis, à peine saillants, de consistance molle, dont le volume varie depuis celui d'un grain de millet jusqu'à celui d'une lentille. Ces petites tumeurs, bien limitées à leur pourtour, siègent sous le péritoine ou dans l'épaisseur même de la séreuse; elles contiennent une substance caséiforme, blanc jaunâtre, onctueuse et grasse au toucher, rappelant celle que l'on trouve dans les kystes dermoïdes. En dehors des points lésés la séreuse ne présente aucune modification apparente.

Des nodules identiques, mais plus abondants encore, se retrouvent sur le mésentère et le grand épiploon; la lame postérieure de ce dernier en est pour ainsi dire criblée. La confluence de ces nodules augmente d'une manière très sensible à mesure qu'on se rapproche du pancréas. Leur nombre total peut être évalué à plusieurs milliers. En arrière du grand épiploon, les anses intestinales sont agglutinées par un exsudat fibrineux, récent, indice d'une péritonite subaiguë localisée.

Le pancréas est augmenté de volume et induré. A la coupe, la trame conjonctive paraît épaissie; elle est, en outre, parsemée de foyers nodulaires absolument semblables par leur forme générale et leur contenu à ceux qui existent sur le péritoine. Au niveau de la tête de l'organe, un de ces foyers a acquis le volume d'une grosse noisette, son centre est occupé par une matière puriforme, blanc jaunâtre. La substance glandulaire ne paraît pas altérée à l'œil nu; les nodules signalés siègent exclusivement dans le tissu conjonctif constituant de la glande.

Les ganglions mésentériques sont légèrement tuméfiés et rouges.

Le foie est un peu congestionné; dans son épaisseur existe un noyau du volume d'une noisette, à contenu caséiforme, blanc jaunâtre, semblable à celui des nodules péritonéaux. La rate et les reins sont normaux.

L'estomac, non dilaté, ne montre aucune altération; l'intestin, examiné dans toute sa longueur, paraît absolument sain.

Les seules lésions constatées se résument donc dans une éruption confluente de nodules spéciaux, d'aspect caséiforme, sur presque toute l'étendue de la séreuse péritonéale, et dans l'infiltration du pancréas par des tumeurs de même nature, plus volumineuses en ce point que partout ailleurs; il semble que cet organe ait été le siège primitif de l'affection, qui de là se serait étendue au péritoine pariétal, au mésentère et à l'épiploon. Le foie, peu atteint, n'a présenté qu'un seul foyer de la même lésion. Enfin une péritonite subaiguë récente faisait adhérer entre elles quelques anses intestinales.

Examen des nodules à l'état frais et sur les coupes après durcissement. — Le contenu des nodules péritonéaux ou pancréatiques, examiné à l'état frais, est formé par une matière amorphe caséo-graisseuse, ne contenant aucun élément cellulaire bien distinct. La coloration par le bleu de Lœffler y montre l'existence de quelques bacilles courts, un peu plus longs que larges, à bouts arrondis, prenant mal la couleur et se décolorant par le procédé de Gram. Tous les ensemencements faits avec le contenu de ces nodules ont donné lieu au développement d'un même bacille dont les caractères seront décrits ci-dessous.

Les coupes intéressant le pancréas ont été surtout utilisées pour l'étude histologique des lésions. Sur les préparations colorées par le picro-carminate d'ammoniaque, les foyers caséiformes constatés dans cet organe à l'autopsie se distinguent aisément. Ils sont, en général, de forme irrégulière et disposés suivant la direction des travées conjonctives ; leur siège est, en effet, dans la trame cellulaire du pancréas, mais leurs limites empiètent parfois sur le tissu glandulaire, qui se trouve alors intéressé dans l'altération. La partie centrale de ces foyers, en voie de désagrégation, est constituée par un amas de leucocytes incolores et de débris cellulaires teints ou non par le carmin. A la périphérie de cette portion centrale se dispose un reticulum fibrinoïde, à travées épaisses, circonscrivant des mailles de dimensions inégales, remplies de leucocytes dégénérés, sans noyau distinct, réfractaires à la coloration ou bien uniformément teints en rouge vif par le carmin, et d'aspect vitreux. Les vaisseaux compris dans l'une et l'autre zone présentent des parois épaissies, comme vitrifiées ; leur cavité est oblitérée par un thrombus homogène, également vitreux. En dehors des points restreints où les acini sont impliqués dans cette mortification des éléments, le tissu glandulaire ne présente aucune altération appréciable. Les lésions constatées se résument donc dans des foyers de nécrose offrant tous les caractères de la nécrose de coagulation.

A l'examen des préparations colorées au bleu de Lœffler et vues à un faible grossissement, les points nécrosés se dessinent comme des taches claires, teintées en bleu très pâle, quelquefois même incolores. Sur ce fond tranchent des îlots ou des traînées très vivement colorées en bleu, et qui, à un fort grossissement, apparaissent constituées par des agglomérations de bacilles. Ceux-

ci abondent surtout au centre du foyer de nécrose; tantôt ils s'y présentent en amas considérables, cohérents, isolés ou reliés entre eux; tantôt ils sont infiltrés dans la masse des éléments mortifiés sous forme de traînées plus ou moins confluentes. Sur toutes les préparations, le nombre des bacilles est considérable au centre des foyers nécrosés. Ils existent aussi, mais beaucoup moins nombreux, dans le réseau fibrinoïde de la périphérie, et y sont plutôt infiltrés que groupés en amas. Leur présence est rare aux limites de la lésion; on ne les retrouve plus dans les portions saines de la glande.

Ces bacilles, identiques à ceux qui avaient été vus dans le contenu des nodules, répondent à une seule et même espèce; ce sont des bâtonnets très courts, deux fois plus longs que larges, à bouts arrondis, isolés ou articulés. La plupart prennent d'une manière homogène le bleu de Lœffler ou la solution aqueuse de violet de gentiane, de fuchsine; d'autres ne se teignent qu'à leurs extrémités et montrent un espace clair à leur centre (pl. IX, fig. 1). Tous se décolorent par la méthode de Gram.

Cultures. — Caractères du microbe. — L'ensemencement sur différents milieux (bouillon, gélatine, gélose) du contenu des nodules recueillis à l'autopsie a donné invariablement des cultures pures d'un microbe toujours identique. C'est un bâtonnet mobile, très court, à peine plus long que large, à bouts arrondis, et dont les dimensions sont en général moindres que celles du microbe observé sur les préparations provenant du malade. Ses articles sont tantôt isolés, tantôt géminés, quelquefois groupés en chaînettes de 10, 15 éléments et même plus. Les bacilles isolés ou disposés par deux sont doués d'un double mouvement très vif de translation et d'oscillation; les longues chaînettes n'ont qu'un mouvement lent, onduleux, flexueux.

Examiné vivant et sans coloration, le bâtonnet présente vaguement l'aspect d'un huit de chiffre et paraît entouré d'une mince zone claire qui lui constitue comme une enveloppe; mais après imprégnation par une solution aqueuse de fuchsine, de violet de gentiane ou de méthyle, on ne constate pas d'image traduisant l'existence d'une capsule véritable. La coloration obtenue n'est pas uniforme dans la longueur du bâtonnet. Ses pôles seuls se teintent vivement tandis que sa partie médiane

reste pâle ou incolore; l'espace clair central est limité latéralement par deux traits colorés. Le microbe ne se colore pas par le procédé de Gram.

Le bacille est indifféremment aérobie et anaérobie. Il prospère rapidement à l'étuve à 37°, mais se cultive aussi, quoique plus lentement, à la température de 15°.

Ensemencé dans du bouillon de bœuf ou de veau neutre, il trouble le milieu en 24 heures, et forme au fond du vase un dépôt blanchâtre, épais et floconneux; le liquide reste d'un louche laiteux et sa réaction est devenue très alcaline.

Inoculé en gélatine, par piqûre, il produit en 24 heures une série de colonies punctiformes, blanchâtres, le long du trait d'ensemencement. A la surface, la végétation est plus abondante, et déjà après 48 heures détermine une liquéfaction du milieu qui progresse lentement par tranches successives, de la superficie à la profondeur; sur la portion non liquéfiée de la gélatine s'accumule un dépôt blanc, floconneux.

Ensemencé en strie sur gélose, le bacille donne, après 24 heures à la température de 37°, une culture humide, opaline, translucide, qui s'étend rapidement au delà du trait d'inoculation et recouvre toute la surface du tube d'une couche mince et uniforme. Ultérieurement la culture s'épaissit un peu, devient blanchâtre, d'aspect crémeux, tout en gardant sa transparence.

Sur pomme de terre, la culture est abondante, épaisse, saillante, humide, un peu visqueuse, d'abord d'un jaune clair, puis d'un jaune brun; la végétation ne se limite pas au point inoculé et envahit rapidement la surface de la tranche.

Toutes ces cultures dégagent une odeur spéciale, légèrement ammoniacale, rappelant celle de l'urine putréfiée. Conservées à l'air libre, elles gardent leur vitalité pendant plusieurs mois; enfermées en tubes clos, à l'abri de l'air et de la lumière, elles sont encore revivifiables après un an.

Ce microbe ne paraît pas former de spores. Un chauffage de 15 minutes à 60°, en milieu humide, le fait périr; mais, après dessiccation, il résiste pendant 5 minutes à la température de 100°.

Inoculation à l'animal. — Les cultures obtenues sont pathogènes pour la souris et le lapin; elles ne produisent aucun effet sur le cobaye, même à dose élevée.

Chez la souris blanche, l'inoculation sous la peau de 1/8 de centimètre cube d'une culture en bouillon datant de deux jours détermine la mort en 48 ou 60 heures, sans lésions spéciales, soit au point infecté, soit ailleurs; mais le bacille s'est disséminé dans le sang et les organes, où il est facile de le déceler par la culture.

Chez le lapin les résultats varient suivant la dose inoculée et le mode d'inoculation employé.

L'injection dans le sang de un centimètre cube d'une culture récente en bouillon provoque une maladie à évolution rapide, mortelle en 36 ou 50 heures, caractérisée surtout par une diarrhée fétide et de la parésie des membres. A l'autopsie on ne constate aucune lésion marquante; les ensemencements faits avec le sang, le foie, la rate, etc., donnent toujours lieu au développement du bacille spécifique.

A dose moindre (demi-centimètre cube) l'injection dans le sang est suivie d'une maladie chronique, marquée au début par de la diarrhée et un amaigrissement transitoires, puis par l'apparition, en différents points du corps, de tumeurs multiples qui rappellent exactement, par leur aspect général et la nature de leur contenu, les nodules caséiformes décrits chez le malade. L'affection ainsi produite est exceptionnellement mortelle; elle est même compatible avec une bonne santé générale lorsque les néoformations ne siègent pas au voisinage d'un organe important, et se termine par guérison après évacuation spontanée du contenu des tumeurs.

Les tumeurs prennent ordinairement naissance dans le tissu cellulaire sous-cutané. Une seule fois, en effet, elles se sont développées dans la cavité thoracique. Tel a été le cas de l'unique lapin qui ait succombé. La mort est alors survenue au 25e jour, précédée de diarrhée, d'une ophtalmie double et d'un amaigrissement progressif. Dans le thorax, de chaque côté de la colonne vertébrale, existait un chapelet de tumeurs contiguës, molles, arrondies, blanc jaunâtres, du volume d'un gros pois et même d'une cerise (pl. IX, fig. 2). Les néoformations, au nombre de huit du côté droit et de sept du côté gauche, comblaient les gouttières costo-vertébrales, n'offrant aucune connexion intime soit avec les os ou le périoste, soit avec les vaisseaux de la région; elles étaient entourées par une atmosphère de tissu

cellulaire hyperémié et œdématié. L'une de ces nodosités, plus volumineuse que les autres, avait comprimé l'aorte thoracique et déterminé l'oblitération de ce vaisseau par un thrombus local sur une longueur de trois centimètres : cette obstruction vasculaire n'avait sans doute pas été étrangère à la mort. En aucun autre point du corps il n'existait de tumeurs similaires, et les viscères ne présentaient pas d'altération notable.

Chez les autres lapins inoculés comme le précédent, les tumeurs se sont exclusivement développées dans le tissu cellulaire sous-cutané, en nombre variable de deux à six, et sans prédilection particulière pour telle ou telle région. Elles apparaissaient de un à deux mois après l'inoculation, tantôt simultanément, tantôt successivement sur les régions cervicale, dorsale, abdominale. C'étaient, au début, des petites nodosités de consistance élastique, indolores, roulant sous le doigt. Par une croissance lente, elles atteignaient le volume d'une grosse châtaigne, et constituaient alors des masses molles rénitentes, toujours mobiles sous la peau. Puis elles s'ulcéraient à leur point culminant et laissaient échapper une substance blanc jaunâtre, semi-fluide, puriforme ; à cette ouverture spontanée succédait une ulcération fongueuse, à bords indurés, lente à cicatriser. Après la disparition de ces tumeurs, il ne s'en produisait pas de nouvelles, la guérison était complète. Quelques animaux portant des tumeurs sous-cutanées ont été sacrifiés au cours de leur maladie, et à des périodes variables après l'inoculation : l'examen le plus attentif n'a décelé chez eux aucune altération des viscères et des cavités splanchniques.

L'inoculation, sous la peau, d'une quantité variant entre 1 et 3 centimètres cubes de culture récente en bouillon, détermine les mêmes effets que l'injection de doses modérées dans le sang, c'est-à-dire une maladie chronique et curable. Les animaux présentent alors de la diarrhée, un amaigrissement progressif ; puis, après un ou deux mois, on voit apparaître dans le tissu conjonctif sous-cutané, tantôt à la région inoculée, tantôt ailleurs, des tumeurs multiples évoluant, comme précédemment, sans lésions viscérales. La marche de la maladie est d'ailleurs celle qui a été indiquée déjà.

Les tumeurs, internes ou externes, observées chez les lapins inoculés, ont présenté des caractères uniformes. A part le volume,

1

2

elles reproduisaient d'une manière complète, par l'aspect extérieur et surtout la nature du contenu, les lésions constatées sur le malade : leur structure, toujours simple, se réduisait à une coque fibreuse, mince, lisse, transparente, distendue par une matière blanc jaunâtre, caséiforme ou caséo-graisseuse, histologiquement semblable à celle que montraient les nodules du malade. Dans les tumeurs récentes, les colorations permettaient de déceler, en très petit nombre il est vrai, le bacille inoculé; mais il n'existait plus de microbes colorables dans les productions anciennes, alors cependant que les ensemencements faits avec leur contenu donnaient toujours lieu au développement abondant du bacille spécifique. Chez tous les animaux, le microbe pathogène n'a pu être trouvé qu'au niveau des lésions caractéristiques et nulle part ailleurs ; il ne saurait être douteux que chez notre malade, comme chez les animaux, l'apparition des nodules ou tumeurs ne soit la conséquence de la pullulation du bacille en tel ou tel point des tissus.

Des détails ci-dessus il ressort que le sujet dont l'histoire fait l'objet de cette note a succombé à une affection parasitaire, caractérisée au point de vue anatomique par la formation de nodules caséiformes dans le péritoine et le pancréas. Ces lésions avaient pour cause immédiate l'évolution *in situ* d'un bacille spécial, différent de ceux qui sont actuellement connus comme pathogènes pour l'homme, et qui, inoculé au lapin, a reproduit chez lui des lésions en foyers semblables à celles du malade.

L'affection décrite est-elle nouvelle ? Il est difficile de l'apprécier ; du moins, nous n'en avons pas trouvé l'analogue dans les publications médicales. Sans doute, si pareille maladie a été observée chez l'homme, elle a dû être confondue avec la tuberculose, dont les nodules jaunes et caséifiés présentent assez exactement l'apparence offerte par les altérations que nous avons eues sous les yeux.

PLANCHE IX, EXPLICATION DES FIGURES

Fig. I. — Bacilles dans un nodule pancréatique de l'homme.

Fig. II. — Tumeurs à contenu caséiforme observées chez un lapin qui a succombé le 23e jour après l'inoculation d'une culture dans le sang.

DU SORT DES SPORES DE MICROBES

DANS L'ORGANISME ANIMAL.

Par M. le Docteur TRAPEZNIKOFF, de Saint-Pétersbourg.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur.)

Tout être vivant semble condamné, vis-à-vis des microbes pathogènes qui l'entourent, à une lutte incessante, qui est surtout périlleuse lorsque ces microbes sont à l'état de germes, de spores résistantes. L'importance étiologique de ces spores n'est plus douteuse, et dès lors on est conduit à se demander comment s'organise la résistance vis-à-vis d'elles. Disparaissent-elles ou non dans un organisme doué de l'immunité? Si elles disparaissent, sous quelle influence le font-elles? Est-ce sous celle des éléments cellulaires, ou des liquides de l'organisme, ou sous les deux à la fois? Si elles ne disparaissent pas tout de suite, combien de temps conservent-elles leur vitalité, et pourquoi ne la manifestent-elles pas dans l'organisme?

Il y aurait un grand intérêt, tant scientifique que pratique, à résoudre cette question, et pourtant elle n'a guère été étudiée qu'en passant, au cours d'autres études bactériologiques. J'ai essayé d'en faire une étude systématique, et de rechercher ce que devenaient des spores de microbes pathogènes, ou non pathogènes, introduites dans l'organisme d'animaux réfractaires ou non réfractaires.

I

Metchnikoff[1] a montré le premier que des spores de microbes pathogènes peuvent périr dans l'organisme animal. A propos d'une maladie infectieuse des Daphnies qu'il a appelée *Spross-*

1. *Archives de Virchow*, 1884, t. IX.

pilzkrankheit, et qui est produite par un parasite qu'il a nommé *Monospora bicuspidata*, il a fait voir que les spores de ce parasite étaient saisies par les leucocytes de la Daphnie, qui les modifiaient peu à peu et finissaient par en faire une masse amorphe.

La destruction des spores par les leucocytes et les cellules fixes a été depuis constatée par d'autres savants, par Ribbert [1], pour l'*Aspergillus fumigatus*, l'*A. flavescens* et diverses espèces de mucor; par Hildebrand [2] aussi pour l'*A. fumigatus*; par Enderlen [3], Vaillard et Vincent [4] pour le bacille du tétanos. Les recherches de Vaillard et Vincent sont particulièrement intéressantes, car elles ont conduit ces savants à expliquer certains faits étiologiques jusqu'ici très obscurs. Vaillard et Vincent ont notamment démontré que les spores du bacille du tétanos, débarrassées de toxines par le lavage, sont rapidement saisies par les leucocytes, qui les modifient et finissent par les faire disparaître.

D'un autre côté Wyssokovitch [5] a montré qu'un bacille inoffensif comme le *B. subtilis* peut conserver près de six mois sa vitalité dans un organisme animal. Smirnof [6] a de même vu des spores du bacille charbonneux persister pendant des semaines, et Bitter [7] a trouvé que ces mêmes spores pouvaient conserver au moins 19 jours leur virulence et leur vitalité dans le corps de moutons doués de l'immunité. Lubarsch [8] a retiré des semences fécondes d'une grenouille qu'il avait inoculée 23 jours auparavant avec des spores charbonneuses, en allant puiser ces semences dans le foie ou les tissus voisins du point d'inoculation. Fischel [9] a retrouvé les mêmes résultats.

Dans une autre direction, Arloing, Cornevin et Thomas [10] ont vu les spores du charbon symptomatique conserver 12 jours leur

1. La destruction des champignons pathogènes dans le corps, Bonn, 1887.
2. *Ziegler's Beiträge*, t. II.
3. *Deutsche Zeitschr. f. Thiermed.*, t. XV, p. 50.
4. *Ces Annales*, 1891, n° 1.
5. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1891, n° 12, p. 456.
6. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. IV, p. 231.
7. *Ibid.*, p. 291.
8. Recherches sur les causes de l'immunité naturelle ou acquise, Berlin, 1891, p. 89.
9. *Fortschritte d. Medizin*, t. XI, n° 2, 1891.
10. Le charbon symptomatique du bœuf, Paris, 1887, 2e édition.

vitalité et leur virulence dans le corps d'une grenouille laissée à la température ordinaire.

Ainsi, en résumé, il y a des cas où les spores pathogènes périssent dans l'animal vivant, et d'autres où elles y conservent leur vitalité et leur virulence. De quoi dépendent des résultats aussi divers? C'est ce qu'on peut essayer de voir en s'adressant à un animal très réfractaire au charbon, comme la grenouille.

Metchnikof a fait voir que les spores du *B. anthracis* se développent facilement dans le corps de la grenouille, à la seule condition d'être protégées contre les leucocytes au moment de leur pénétration. Dans la chambre antérieure de l'œil d'une grenouille conservée à 18-22°, elles ne rencontrent que peu ou pas de leucocytes et se développent. Sous la peau du même animal, elles se développent aussi, à la condition d'être protégées contre les globules blancs par un sac de papier buvard, d'ouate, ou un lambeau d'intestin (Petruschky), qui ne laisse passer que les liquides, et présente un léger obstacle à la pénétration des leucocytes. En dehors de cette protection, elles périssent, et dans des préparations de lymphe faites 3 jours après l'introduction directe de spores dans le sac lymphatique du dos de la grenouille, Metchnikof a vu que ces spores se coloraient mal et étaient contenues dans les leucocytes. Hueppe, qui a vérifié les résultats de ces expériences, les représente comme un *experimentum crucis* de la théorie des phagocytes.

Lubarsch [1] a vu aussi les spores, protégées par une enveloppe, se développer en filaments, et celles qui n'étaient pas protégées être saisies par les leucocytes; mais il a vu aussi beaucoup de spores, protégées ou non, ne pas se développer, tout en restant libres dans le suc organique, et des constatations pareilles ont conduit Baumgarten [2] et ses élèves Petruschky [3] et Fahrenholz [4] à admettre que les globules blancs ne sont pour rien dans le phénomène, qui serait uniquement dû à une propriété du milieu, le rendant impropre au développement des bactéries. Leur

1. *Loc. cit.*, p. 128.
2. L'*experimentum crucis* de la théorie des phagocytes. *Ziegler's Beiträge*, t. VII, p. 1.
3. Recherches sur l'immunité de la grenouille vis-à-vis du charbon. *Diss. Iena*, 1888.
4. Contribution à la critique de la théorie de Metchnikoff sur les phagocytes. *Diss. Königsberg*, 1889.

destruction est due aux liquides de l'organisme, et si elles réussissent à se développer dans une grenouille maintenue à la chaleur, c'est que la lymphe deviendrait à la chaleur plus propre au développement du microbe. L'immunité de la grenouille serait donc une question de nature et de propriétés de la lymphe. Petruschky [1] a vu depuis que les spores renfermées dans des sacs se transforment en filaments, et Rohrschneider [2], qui est revenu sur l'étude de l'influence de la température sur des grenouilles nourries avec des spores charbonneuses, n'a pas pu décider nettement si les grenouilles succombent aux effets directs de l'ingestion des spores, ou à l'infection partie des muqueuses modifiées par la chaleur.

II

J'ai d'abord repris les expériences de Metchnikoff sur la *Sprosspilzkrankheit* des Daphnies, en profitant de ce que cette maladie est très répandue chez les daphnies du bassin des reptiles au Jardin des Plantes. Il suffit, pour examiner ces animaux, de recouvrir la goutte d'eau qui les contient d'une lamelle de verre, supportée par plusieurs bandelettes de papier buvard, de façon à ne pas comprimer les daphnies, et à leur laisser une certaine mobilité. On réussit ainsi, avec quelques tâtonnements, à trouver l'épaisseur convenable, et les daphnies peuvent rester longtemps vivantes. Il est facile d'y trouver les spores fusiformes du parasite : on en voit en particulier qui ont une moitié encore engagée dans la paroi de l'intestin, et leur autre moitié, extérieure, entourée de nombreux leucocytes. La partie ainsi enveloppée, ou toute la spore, si elle est tout entière saisie, se colore, prend bientôt un aspect irrégulier, rongé, et à la place d'un corps fusiforme, réfringent et blanchâtre, on a une petite masse ronde ou irrégulière, jaune brun, ou même noire. Dans certains cas, la partie attaquée se présente sous forme d'un renflement sphérique, de couleur jaune brun, situé à l'extrémité de la spore : d'autres fois, elle prend l'aspect d'un corps allongé irrégulier, alternativement dilaté et étranglé. (Pl. X, fig. 1 et 2.)

1. Action du corps de la grenouille vivante sur les bacilles charbonneux, *Zeitschr. f. Hyg.*, 1889, p. 75.
2. *Ziegler's Beiträge*, 1891, t. IX, p. 515.

Les épisodes de la lutte entre la daphnie et son parasite sont faciles à suivre : sur les daphnies vivantes, les spores se multiplient par bourgeonnement, forment une masse de conidies, et la daphnie finit par périr.

Aucun réactif acide ou alcalin ne m'a permis de faire subir aux spores des modifications pareilles à celle que nous venons de voir produites sous l'influence des leucocytes. Il est évident que les cellules vivantes possèdent pour cela des propriétés particulières, qu'il y a vraiment lutte cellulaire, dans laquelle la daphnie succombe quelquefois, et mes observations confirment pleinement celles de Metchnikoff sur le rôle actif que jouent dans cette lutte les cellules amiboïdes de l'animal.

III

S'il y a des cas dans lesquels les spores pathogènes périssent dans l'organisme animal, il y en a aussi, nous l'avons vu, dans lesquelles elles conservent leur vitalité et leur virulence. Que se passe-t-il alors du côté de l'organisme envahi? Laisse-t-il se développer son parasite comme quelques savants le disent? Maintient-il inertes les spores, comme le pensent d'autres? La question a été surtout résolue de façons diverses à propos de la grenouille maintenue à la température ordinaire, et j'ai jugé utile d'en reprendre l'étude expérimentale.

De février à juin 1890 et d'octobre 90 à janvier 91, j'ai injecté à de nombreuses grenouilles, gardées les unes à 16-22°, les autres dans une étuve, aux températures de 25° à 37°,5, des spores charbonneuses pures, provenant de vieilles cultures sur gélose, peptonisée ou non, suivant la méthode de Buchner. Les spores prises telles quelles, ou après un lavage préalable à l'eau stérilisée, étaient injectées dans le sac lymphatique, soit en libre suspension dans l'eau, soit portées sur un fil de soie entouré d'un sac de papier buvard.

La grenouille inoculée, conservée dans un grand bocal où elle avait tout l'air nécessaire, et où elle était à l'abri des variations brusques de température, était ensuite examinée à divers intervalles variant de 30 minutes à plusieurs jours. On prélevait au point d'inoculation, au moyen d'un tube de verre effilé et stéri-

lisé, des gouttelettes de lymphe qui servaient à faire des préparations colorées d'après la méthode de Ziehl, avec une solution de fuchsine dans de l'eau phéniquée, et avec du bleu de méthylène. Avec des solutions fraîches de bonne fuchsine, et si la gouttelette a été bien étalée, on obtient facilement la double coloration. Après un séjour de 12 à 17 heures dans la solution froide de fuchsine, ou de 5 minutes dans la solution presque bouillante, on décolore par l'alcool absolu, quelquefois après un passage dans l'alcool légèrement acidulé, on lave à l'eau et on colore à nouveau avec une solution faible de bleu de méthylène. Pour ne pas provoquer de modifications dans les cellules, je desséchais d'ordinaire à froid ou à l'aide d'un mélange d'alcool et d'éther, au lieu de fixer à chaud.

On voit ainsi que le développement des spores et leur saisie par les leucocytes se font simultanément dans les grenouilles conservées à la température ambiante. Trois quarts d'heure après l'injection, on voit des spores colorées en rouge et les gaines des filaments qu'elles ont abandonnées, et, au voisinage, d'autres spores contenues dans les leucocytes. Au bout de 3 à 6 heures, les leucocytes forment déjà de grands foyers. Au milieu de spores encore rouges, on en trouve de colorées en bleu et leur nombre augmente de plus en plus (pl. X, fig. 3). Plus tard, on voit apparaître des bacilles, et au bout de 48 à 72 heures environ, il y a un grand nombre de filaments, les uns libres (fig. 5), les autres contenus dans les leucocytes, dont quelques-uns sont tellement bondés de bacilles que le noyau de la cellule devient difficile à voir. Il y a aussi, en liberté ou dans les leucocytes (fig. 4, 7), des spores colorées en rouge ou en bleu, et même certains leucocytes contiennent à la fois des spores diversement colorées et des bacilles; ils sont alors sphériques. Quelques-uns, trop remplis, ont évidemment éclaté, et leur contenu apparaît étalé sous forme d'une masse conique située près du noyau coloré. On voit aussi des débris du noyau, sous forme de corpuscules ronds, colorés en bleu. Sur le grand nombre des leucocytes, il n'y en a que quelques-uns ne contenant pas de bacilles ou de spores.

Au début, les bacilles et les filaments, libres ou enfermés dans les leucocytes, se colorent bien en bleu (fig. 6). Plus tard, on en trouve qui prennent mal la couleur, et le fait est plus fréquent

dans les bacilles englobés que dans ceux qui sont restés libres. Peu à peu le nombre de spores et de bacilles libres diminue, celui des éléments englobés augmente.

Au bout de 5 à 6 jours, les spores colorées en bleu deviennent rares; les spores colorées en rouge prédominent dans les leucocytes, qui ne contiennent plus guère de bacilles ni de filaments. Plus tard, ces derniers disparaissent, et on ne trouve plus que des cellulles contenant des spores colorées en rouge.

Au bout de 10 à 15 jours, on ne trouve plus que des leucocytes contenant des spores, quelquefois très nombreuses, mais le nombre des leucocytes a diminué, et un grand nombre de cellules ne contient plus de spores. Enfin, après 30 jours, les leucocytes ne sont pas plus nombreux qu'à l'état normal, et on peut admettre que tout est rentré dans l'ordre. Toutefois il arrive de trouver encore des cellules renfermant un grand nombre de spores sur des préparations de lymphe faites de 70 à 100 jours après l'inoculation.

Tout cela témoigne de la lutte qui s'engage de suite entre les leucocytes et les spores. Celles que j'injectais étaient pures, sans bacilles ni filaments, et ce n'est qu'exceptionnellement qu'on y voyait des restes d'anciens filaments ayant donné naissance à des spores. Quelques-unes de ces dernières commencent à se développer aussitôt introduites. Le stade bleu de la spore ou de l'ovoïde court correspond à ce commencement de germination qu'on constate chez les spores libres non englobées par les leucocytes. Mais spores et bâtonnets sont saisis et peu à peu détruits par les leucocytes. Les spores, saisies avant d'avoir eu le temps de se développer, restent intactes dans les leucocytes et se colorent en rouge comme les spores libres. Cette explication est adéquate aux faits, et il n'est nullement nécessaire d'attribuer à l'organisme des propriétés particulières, plus ou moins problématiques.

En résumé, l'organisme de la grenouille, maintenue à la température ordinaire, se prête très bien au développement des spores, qui germent lorsqu'elles sont introduites sous la peau à l'état libre et sans aucune protection contre les leucocytes. On ne peut pas dire alors que la lymphe a été modifiée par la filtration ou la chaleur. Les conclusions de Baumgarten et de ses élèves semblent donc erronées, et si les spores germent quand

on les inocule, entourées d'un sac en papier ou d'une membrane d'intestin (procédé Petruschky), ce fait ne saurait être attribué à ce que la lymphe aurait perdu, par filtration, ses propriétés nocives.

Enfin ces mêmes expériences montrent aussi, contrairement à l'assertion de R. Koch soutenue par Petruschky, que les spores et les bacilles ne se développent pas quand ils ont été saisis par les leucocytes. Les spores et bacilles colorés en bleu augmentent d'abord en nombre, puis sont pris par les cellules, et disparaissent alors successivement à l'extérieur et à l'intérieur des cellules qui, plusieurs jours après l'infection, ne contiennent que des spores rouges inertes, mais encore vivantes, et capables de se développer en dehors des leucocytes, comme nous allons le voir, de sorte qu'il est impossible d'aller chercher ailleurs que dans ces leucocytes les causes du non-développement de ces spores dans l'organisme.

IV

Nous avons vu le nombre des leucocytes augmenter progressivement au voisinage du point d'inoculation et, en même temps, le nombre des spores y diminuer de plus en plus. D'autre part, on sait que les spores sont portées en différents points de l'organisme. Il semble donc naturel d'attribuer, pour une grande part, ce transport aux leucocytes [1], et les faits suivants montrent que cette idée est juste.

1. Il est évident que les spores peuvent être transportées, chez les mammifères, dans le ganglion voisin du point de l'inoculation sous-cutanée, comme cela a dû se passer dans les expériences de *M. Phisalix*, rapportées dans les *Archives de médecine expériment.* (1891, n° I, p. 159.) D'après ce savant, la stérilité du sang et de la rate de ses animaux d'expérience, alors que les cultures du ganglion sont fécondes, sont « des faits extraordinaires, surtout si on les envisage sous l'influence des idées courantes relativement au rôle des leucocytes » (*l. c.*, p. 161). Nous considérons, au contraire, comme tout à fait naturel qu'un organe qui renferme des germes, transportés dans son intérieur, et aussi résistants que les spores charbonneuses, donne, ensemencé dans du bouillon, une culture de bactéridies. Nous avons observé des phénomènes analogues après l'introduction de spores dans le sang ou dans le sac lymphatique, d'où elles ont été emportées dans différents organes. Nous ne pouvons seulement accepter l'opinion de *M. Phisalix*, qui attribue au charbon la mort des animaux ayant succombé longtemps après avoir été inoculés, et dont, seul, le ganglion voisin du point d'inoculation donnait à l'ensemencement un développement de bactéridies. M. *Phisalix* n'a fourni aucune preuve que, dans ces cas, il ne s'agissait pas seulement d'une mort accidentelle de ses animaux inoculés, dont le ganglion pouvait naturellement conserver des germes vivants.

Sur une grenouille morte 21 jours après l'inoculation, j'ai trouvé des spores dans les macrophages du foie et dans les leucocytes de la rate ; quelques-unes de ces cellules contenaient 12 à 15 spores et même davantage. Sur deux autres grenouilles, tuées l'une 78 jours, et l'autre 79 après l'infection, on trouva également des spores dans les cellules du foie et de la rate. En présence de ces faits, en voici d'autres qui montrent que des spores saisies vivantes par des leucocytes conservent longtemps leur vitalité et leur virulence.

Toutes les expériences suivantes ont été faites en inoculant sous la peau, avec des spores charbonneuses, des grenouilles qu'on conservait à la température de la chambre ; on soumettait à diverses époques le contenu du sac lymphatique de ces grenouilles ou de leurs organes à des examens variés.

A. Des spores restent vivantes après 17 *jours passés dans l'intérieur des leucocytes.* Pour le montrer, j'ai additionné d'un peu de bouillon une goutte de lymphe, et j'ai fait avec ce mélange des gouttes suspendues, que je mettais en chambre humide, dans un thermostat à 35° 5, après m'être assuré qu'il n'y avait dans la goutte ni bacilles ni filaments, et seulement des leucocytes dont quelques-uns contenaient un grand nombre de spores. Au bout d'une heure, on voyait quelques leucocytes devenus sphériques, pendant que d'autres avaient conservé leur mobilité. Après 3 heures, on trouvait dans les gouttes des bacilles et des filaments, ce qui démontrait que le développement et la transformation des spores avaient débuté dans les cellules. En faisant avec la goutte des préparations desséchées, et colorées avec la fuchsine et le bleu de méthylène, on voyait des bacilles développés dans les cellules, des filaments encore contenus à moitié dans la cellule, des spores non développées sans qu'on puisse dire pour quelles causes, et des bacilles en dehors des leucocytes.

B. Des spores restent vivantes après un long séjour dans l'organisme de la grenouille. Pour le montrer il suffit d'ensemencer, à diverses époques après le moment de l'infection, la lymphe ou le suc de divers organes de la grenouille sur gélatine ou sur gélose dans les soucoupes de Petri, et d'y surveiller le développement du *B. anthracis.* Voici le résumé de mes expériences.

N° de l'expérience	Nombre de jours écoulés depuis l'inoculation	Température à laquelle la grenouille a été maintenue	ORGANES ENSEMENCÉS					OBSERVATION
			lymphe	poumon	foie	rate	reins	
1	24	14 à 20°	0	0	+	+	0	tuée
2	27	»	+	+	+	+	+	»
3	55	14 à 23°	0	+	+	+	+	morte
4	60	»	?	?	?	+	?	tuée
5	62	14 à 26°	0	+	+	+	0	»
6	66	»	0	+	+	+	+	»
7	77	»	—	—	+	+	+	»
8	39	15 à 20°	+	+	+	+	+	morte
9	78	12 à 22°	—	+	+	+	+	tuée
10	79	»	—	+	+	+	?	»
11	70	»	—	+	+	+	+	»
12	100	»	+	+	+	+	+	»

Ainsi, après 100 jours, il y a encore des spores vivantes dans la lymphe et les organes.

C. Les spores restées vivantes ont aussi conservé leur virulence. Pour le montrer, il suffit de faire des cultures sur gélose avec les colonies obtenues dans les soucoupes de Petri, et d'inoculer des cobayes et souris blanches, qui meurent dans les délais habituels, comme le montrent les expériences suivantes, dont les numéros se rapportent aux chiffres du tableau précédent.

Exp. 1 Deux cobayes inoculés sont morts en 44 à 46 heures.
— 9 Une souris blanche inoculée est morte en 22 —
— 10 — — 20 —
— 12 — — 36 à 40 —

La virulence peut dont persister au moins 100 jours, et peut-être davantage, dans les organes d'une grenouille maintenue à l'abstinence dans un bocal à la température de la chambre. Peut-être les spores périraient-elles plus vite chez une grenouille conservée dans les conditions normales, mais leur disparition serait sans doute lente; et le seul rôle que nous trouvions aux leucocytes, du moins dans nos expériences, est d'empêcher le développement des spores charbonneuses, mais non de les tuer.

D. Les spores ne subissent aucune action nocive de la part des sucs organiques de la grenouille, et s'y développent dès la destruction

des cellules qui les ont saisis. Pour le démontrer, il m'a suffi de recommencer les expériences du § *A* avec de la lymphe pure, prise dans le sac lymphatique du dos des grenouilles infectées. Cette lymphe prélevée 15 jours après l'inoculation, et mise en gouttes suspendues, a passé par les mêmes stades de développement que le mélange de lymphe et de bouillon du § *A*. On y voyait très nettement des spores se transformer en bacilles pendant que d'autres restaient inertes. Après 3 heures de séjour dans le thermostat, on voit déjà les premiers signes de la germination des spores. Après 5 heures, on voyait apparaître des filaments, qui, au bout de 20 heures, formaient un feutrage épais. J'ai retrouvé les mêmes résultats avec de la lymphe puisée 26, 70, 77 et 100 jours après le moment de l'infection. Il reste donc démontré que ce n'est pas la lymphe, mais le leucocyte qui empêche les spores de germer, puisque le leucocyte mort, les spores qu'il contenait se développent dans la lymphe. Ceci confirme évidemment l'absence de propriétés bactéricides dans la lymphe de la grenouille.

V

Nous venons de voir que chez les grenouilles conservées à la température de la chambre, les leucocytes arrêtent, tant qu'ils restent vivants, le développement des spores ; s'ils meurent, ces spores se développent; mais, sur l'animal vivant, les bacilles qu'elles fournissent sont saisis par d'autres leucocytes, et, à la condition que cette mort des leucocytes, qui survient aussi sur l'animal vivant, et que cette mise en liberté des spores, qui en est la conséquence, ne se fassent que progressivement et avec lenteur, l'organisme peut arriver à détruire tous ses parasites sans subir d'atteinte bien sensible. Mais il est clair que si nous diminuons par un moyen quelconque l'énergie et l'activité des leucocytes, l'animal pourra succomber. C'est précisément à quoi on arrive en conservant les grenouilles à des températures élevées, entre 34° et 37°.

On trouve alors, en employant le même mode d'observation que tout à l'heure, que les spores sont encore saisies par les leucocytes, mais que ces derniers arrivent moins nombreux ; la

phagocytose est faible; les spores donnent des bacilles, et l'animal succombe. Pourtant, sur les préparations colorées, on trouve un grand nombre de cellules contenant des spores teintées en rouge et non développées. Ceci prouve qu'il y a encore une lutte, mais une lutte plus inégale, et dont les bacilles sortent vainqueurs.

Lubarsch (*l. c.*) a vu que les grenouilles habituées à des températures élevées supportent aussi bien l'infection charbonneuse que les grenouilles ordinaires. J'ai vu de mon côté que celles-ci, infectées de spores charbonneuses et gardées à la température de la chambre, peuvent dans certains cas, rares il est vrai, ne pas succomber au charbon quand on les met dans une étuve à 34-37°, et vivre longtemps dans ces conditions.

Le 13 mars 1890, on met dans l'étuve une grenouille infectée depuis 19 jours par des spores charbonneuses, et on l'y laisse 11 jours. La grenouille, notablement affaiblie par ce séjour, est retirée, et 42 jours plus tard, c'est-à-dire 72 jours après la première infection, elle est de nouveau inoculée avec des spores charbonneuses et remise dans l'étuve à 37°.

L'examen microscopique des préparations de la lymphe, prise quatre heures plus tard, a démontré la présence de bacilles, de longs filaments libres et de spores colorées en rouge. Les cellules renfermaient également un grand nombre de bacilles, de filaments et de spores. La grenouille a succombé après 24 heures d'étuve, avec hypertrophie de la rate et du foie; ce dernier était jaune pâle et atteint de dégénérescence graisseuse. La lymphe et les organes contenaient beaucoup de bacilles et ont donné des ensemencements féconds.

Voici un autre exemple. Le 22 octobre 1890, une série de grenouilles maintenues à 16° es inoculée avec des spores charbonneuses provenant d'une culture fraîche sur gélose.

Dans a lymphe prise sur une grenouille[1] 30 minutes après l'infection, on trouvait déjà des spores dans des cellules, et leur nombre était grand après 33 heures. 62 jours après l'infection, on met pendant 5 heures cette grenouille à l'étuve à 35°, après quoi on la porte à l'étuve à 40-41°. Retirée presque

1. L'infection avait eu lieu en introduisant un grand nombre de spores dans le sac lymphatique dorsal.

sans signe de vie après 10 minutes à cette température, elle revient dans l'eau froide, où elle reste pendant 26 jours à la température ordinaire. On la remet le 19 janvier 1891 dans l'étuve à 36°-37°, où elle reste 6 jours. A ce moment, c'est-à-dire 94 jours après l'infection, on trouvait, dans la lymphe du sac dorsal, des cellules renfermant des spores : beaucoup en contenaient de 15 à 20. D'autres contenaient aussi des bacilles faiblement colorés en bleu et évidemment dégénérés. Par places, des bacilles libres et des filaments courts. Il est clair que quelques spores ont pu germer et donner des bâtonnets qui ont été saisis par les leucocytes.

Une goutte de lymphe semée sur gélose, d'autres mises en gouttes suspendues, ont donné partout des développements abondants, et une souris, inoculée avec ces cultures, est morte du charbon en moins de 36 heures. Les spores n'avaient donc perdu ni leur vitalité ni leur virulence après 94 jours passés dans les cellules de la grenouille.

Cette grenouille a encore été laissée 14 jours à l'étuve, soit en tout 21 jours, et le 9 février 1891, elle a reçu sous la peau un grand nombre de spores provenant d'une culture sur gélose datant du 4 mars 1890, restées longtemps dans de l'eau stérilisée, et par conséquent ne contenant pas de bacilles.

18 heures après, des préparations colorées de la lymphe montrent une accumulation considérable de leucocytes, dont beaucoup renferment de grandes quantités de spores rouges et bleues, de bacilles et de filaments (voir photogrammes 2 et 3, pl. XI). Quelques-uns, bondés de spores, principalement de spores rouges, ont pris une forme sphérique. Le nombre de spores libres et de bacilles n'était pas grand, mais on rencontrait de longs filaments libres, bien colorés en bleu.

Après 48 heures, les différences étaient déjà très accusées. Les préparations ne montraient presque plus de bacilles et de filaments libres, et bien qu'on rencontrât des leucocytes contenant, à côté des spores, des bacilles et des filaments, le nombre de ces derniers était faible. Les leucocytes contenant des spores rouges prédominaient dans toutes les préparations. Par places, on trouvait des macrophages ayant absorbé, d'une part des microphages avec leur contenu, et d'autre part des spores isolées (voir fig. 8). Les bacilles et les filaments renfermés dans les

cellules étaient dégénérés et se coloraient mal. Le nombre des bacilles et des filaments semblait plus grand que dans les préparations précédentes.

Sur les préparations faites 71 heures après l'injection, on ne trouvait plus de bacilles ni de filaments libres; les spores libres étaient aussi rares. Les cellules étaient remplies de spores rouges et, par places seulement, on en trouvait qui renfermaient des restes de filaments faiblement colorés. L'accumulation des leucocytes semble toujours très grande, et la grenouille a encore un bon aspect.

Sur les préparations de lymphe prélevée 9 jours après la seconde infection, la grenouille restant toujours dans l'étuve, on trouvait déjà peu de leucocytes, dont un petit nombre seulement contenait des spores rouges. Nulle part de spores ou de bacilles libres.

Le 22 février 1891, la grenouille est retirée de l'étuve, où elle est restée 33 jours; elle est toujours très vigoureuse. Elle est donc restée vivante 120 jours après l'infection.

Ces expériences montrent qu'une première infection ne rend pas l'animal impropre au développement du microbe inoculé à nouveau. Elles contredisent la théorie dite de l'*épuisement*, et les conclusions de MM. Baumgarten. Petruschky, Fahrenholtz et autres partisans de cette théorie. Elles confirment les recherches de Lubarsch qui, par une série d'expériences sur les lapins et les cobayes. a démontré l'inexactitude de la théorie précédente [1].

Nous venons de voir que sur cette grenouille soumise à deux infections successives, et malgré le grand nombre de spores introduit à chaque fois, les spores ayant germé disparaissaient très vite, de sorte qu'elles devenaient très rares après 48 heures. En ne faisant l'examen que 48 ou 60 heures après l'infection, on n'aurait trouvé que des spores renfermées dans les cellules, de sorte qu'on aurait pu conclure que leur développement ou ne se produit pas, ou ne fait que commencer, alors qu'en réalité le processus est déjà fini. C'est là ce qui me semble expliquer comment M. Lubarsch a pu dire que chez certaines grenouilles

1. Une autre grenouille de la même série a été mise, 84 jours après l'infection, dans une étuve à 34-37°, d'où elle est sortie, au bout de 6 jours, encore très vigoureuse. Elle a vécu encore quelque temps, puis a succombé à une cause accidentelle.

mises à l'étuve à 28-31°, les spores ne sont pas encore développées au bout de 48 heures.

D'un autre côté, aux températures basses, de 12° à 14°, le développement des spores est plus lent, et elles sont saisies par les leucocytes avant de l'avoir commencé, ou de l'avoir poussé au delà de ses premières phases. Ceci peut laisser croire que les spores ne se développent pas dans la lymphe à la température ordinaire. Comme M. Fahrenholtz faisait ses premières préparations 4 jours après l'infection, et même plus tard, on comprend qu'il a dû ne pas observer de développement des spores.

Je me suis assuré, dans deux séries d'expériences conduites de tous points d'une façon comparative, que les spores se comportent exactement de la même façon avec la *Rana esculenta* et la *Rana temporaria*.

Mes expériences démontrant que les spores charbonneuses se développent à la température ordinaire dans le sac dorsal de la grenouille lorsqu'elles ne sont pas défendues contre les leucocytes, j'ai cru utile de répéter les expériences dans lesquelles on les inocule après les avoir protégées par une membrane d'intestin ou un sac en papier. Pour tenir compte de l'opinion de M. Baumgarten et de ses élèves, j'ai introduit sous la peau de la grenouille des fils chargés de spores, et entourés d'un sac en papier buvard. J'ai toujours vu ces spores se transformer en longs filaments, tandis que celles que j'inoculais en même temps et sans protection sous la peau étaient saisies par les leucocytes avant germination ou aux premières phases de leur développement. Dans ce dernier cas, il n'y avait pas de longs filaments, et le nombre des bacilles était beaucoup plus faible que dans les sacs en papier buvard. On trouvait en même temps, tant dans le sac qu'en dehors, des spores libres non développées, quoique jamais en nombre aussi grand que le dit Lubarsch, mais on en trouve aussi qui restent inertes quand on les sème sur un milieu nutritif à basse température. Dans le corps de la grenouille, la basse température n'empêche pas la phagocytose, et une fois les spores saisies par les leucocytes, elles ne pourront plus germer, même quand on les placera dans des conditions favorables à leur développement. Ces expériences contredisent donc d'une façon décisive les déductions de MM. Baumgarten et de ses élèves, déductions basées sur des expériences analogues.

VI

Poules. — On sait que les poules jouissent, vis-à-vis du charbon, d'une immunité naturelle très marquée, qu'on peut pourtant faire disparaître par divers procédés : réfrigération (Pasteur), inanition (Canalis et Morpurgo). Pour savoir ce que devenaient les spores inoculées à ces animaux, j'ai opéré sur des poules vigoureuses et maintenues dans leurs conditions de vie normales.

Pour éviter le transport des spores loin du point d'inoculation, j'opérais de la façon suivante. Après avoir lavé au sublimé la région de la peau où l'infection allait être faite, je préparais, avec une aiguille lancéolée, sous la peau de la poule, une sorte de poche, où j'introduisais, à l'aide d'un tube effilé, des amas de spores provenant directement d'une culture sur gélose, ou lavées au préalable dans l'eau distillée. L'orifice extérieur de la poche était ensuite fermé avec du collodion, et le point d'inoculation marqué au crayon. On pouvait ainsi le retrouver sûrement, et aller y puiser des matériaux pour l'étude. Il serait difficile à retrouver sans ces précautions, car il ne s'y produit guère depus ni d'œdème, et beaucoup d'insuccès n'ont pas d'autre explication que des erreurs provenant de ce chef.

En faisant, avec la lymphe prise au point d'inoculation 3 à 4 heures après l'infection, des préparations colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, on y trouve une accumulation de leucocytes dont beaucoup sont littéralement bondés de spores rouges (pl. X, fig. 9), deviennent sphériques, et ne sont reconnaissables que grâce à leur noyau fortement coloré en bleu. En outre, dans quelques cellules, à côté des spores rouges, on trouvait des spores bleues, des bacilles et des filaments courts (voir fig. 10). On voyait en même temps, en dehors des cellules, un assez grand nombre de spores libres, rouges, plus rarement bleues, des bacilles et des filaments. On pouvait donc suivre toutes les phases du développement de la spore jusqu'au filament.

Sur des préparations faites 17 heures après l'infection (et provenant d'une autre poule), on voyait un petit nombre de filaments courts à 5 ou 6 articulations; filaments minces et filaments épais contenant des gaines ou des restes d'anciennes gaines

abandonnées par les spores. On trouvait en plus des spores libres et un grand nombre de leucocytes renfermant des spores rouges. Tous ces éléments étaient bien colorés.

Sur les préparations faites 44 heures après l'infection, le nombre des spores libres a notablement diminué; les bacilles et les filaments sont devenus rares, mais on trouve toujours des leucocytes renfermant des spores.

Au bout de ce temps, il devenait impossible de retirer de la lymphe du point d'inoculation. Ce dernier se dessèche, l'œdème et la suppuration disparaissent, et, au bout de quelques jours, on ne retrouve plus ni bacilles ni filaments.

Quand on fait l'inoculation dans la crête ou les caroncules, la région se tuméfie et devient œdémateuse, mais il n'est pas facile d'y trouver les cellules remplies de spores, qui sont rapidement emportées loin du point d'inoculation.

Quoi qu'il en soit, on voit que bien que les spores se développent dans l'organisme de la poule, celle-ci n'en paraît pas moins bien portante, mais elle est en réalité atteinte par l'infection charbonneuse, car à l'autopsie de poules tuées deux mois à deux mois et demi après l'infection, je trouvais l'intestin noyé dans une masse de graisse, le foie hypertrophié, pâle, jaunâtre, ayant aussi subi la dégénérescence graisseuse, et, au niveau du cœur, des dépôts considérables de graisse.

Pour savoir combien de temps les spores du charbon conservent dans l'organisme de la poule leur vitalité et leur virulence, j'ai fait les expériences suivantes. J'ai réfrigéré des poules infectées depuis plus ou moins longtemps, en les mettant dans des filets plongeant dans de l'eau à 25°. Le ventre seul de la poule était immergé, le reste du corps était sec. La durée du bain a été de 24 à 27 heures. Dans quelques cas, on a changé 2 ou 3 fois l'eau du bain, jusqu'à ce que la poule tombât dans un état comateux : on arrive ainsi à faire tomber à 26° la température initiale, qui est de 40°,5 — 42,°1.

Sur six poules dont la réfrigération a ainsi commencé de 3 à 6 jours après l'infection, deux seulement ont succombé au charbon. Les poules réfrigérées 14, 16, 18 et 30 jours après l'infection ne sont pas mortes charbonneuses, bien que le nombre des spores introduites fût considérable, la réfrigération intense et l'affaiblissement des animaux excessif.

Dans un cas, l'expérience a été faite sur un grand coq vigoureux qui a supporté, trois jours après l'infection, un bain de 24 heures sans paraître en souffrir, et en conservant une température de 40°. Après un second bain de 47 heures, donné presque immédiatement après le premier, la température tomba à 38°.5; mais le coq était encore en bon état, mangeait bien, et ce n'est qu'après un 3e bain de 25 heures que la température tomba à 28°, et que l'œdème parut au point d'inoculation, qui était la caroncule. Sur les préparations faites avec des parties prises à ce niveau, on trouva des bacilles et un grand nombre de filaments courts. Le coq fut alors mis dans une étuve à 36°, mais sa température alla en s'abaissant de plus en plus, et l'animal mourut du charbon. Le sang et les organes contenaient un grand nombre de bactéridies.

Les spores ont donc conservé pendant six jours, dans l'organisme de ce coq, leur vitalité et leur virulence. Nous avons vu plus haut qu'elles les perdaient au bout de 14 jours. Comme nous avons vu que dans la poule non refroidie, elles pouvaient se développer au début, et qu'elles y étaient saisies par les leucocytes, il est évident que c'est aussi à ces leucocytes qu'il faut attribuer leur non-développement, même dans les poules refroidies, et peut-être leur destruction. On peut donc conclure de ces faits que l'immunité des poules contre le bacille du charbon dépend en grande partie de l'action des cellules. Il suffit, comme chez les grenouilles, d'affaiblir l'énergie des leucocytes, de paralyser leur action sur les spores saisies, et aussitôt celles-ci provoqueront la mort de l'animal.

Ces expériences confirment l'opinion de Pasteur et les conclusions de Wagner [1] relatives au rôle des phagocytes. Par contre, elles contredisent formellement l'opinion de M. Netchaïeff [2], d'après lequel les leucocytes des oiseaux saisissent très rarement les bacilles, surtout chez la poule, dont les leucocytes, dit-il, *sont si petits comparativement aux bacilles*, que la phagocytose y est exceptionnelle.

Pigeons. — Les savants ne sont pas d'accord au sujet de l'immunité des pigeons contre le charbon. Les uns (Czaplewsky,

1. *Ces Annales*, t. IV, p. 570.
2. Le rôle des leucocytes dans l'infection par les bactéries. *Diss. inaug.*, Moscou, 1890, pp. 76 et 78.

Netchaïeff) la considèrent comme absolue, les autres (Straus, Metchnikoff, Œmler) comme relative. Dans les expériences de Canalis et Morpurgo, deux pigeons seulement ont péri du charbon sur 12 inoculés; dans les expériences de Kitt, 2 sur 17. Pour M. Savtchenko [1], le pigeon adulte est absolument réfractaire vis-à-vis de cultures faites en dehors de l'organisme, mais peut céder à des cultures ayant passé par l'organisme affaibli d'un autre pigeon. Mes expériences ont porté sur 3 pigeons, dont deux se sont montrés réfractaires vis-à-vis d'inoculations répétées : le troisième, un jeune pigeon, a succombé au charbon, 7 jours après l'infection par des spores.

Quand on introduit sous la peau d'un pigeon un fil chargé de spores, ou des spores libres prises directement sur les cultures ou après un séjour préalable dans l'eau, on voit les phénomènes suivants.

Sur les préparations faites 4 heures après l'introduction des spores dans le tissu cellulaire sous-cutané du thorax ou des pieds, on trouve une accumulation considérable de leucocytes, et un grand nombre de cellules renfermant des spores colorées en rouge, enfin d'autres contenant, à côté de spores rouges très nombreuses, des spores bleues, des bacilles et des filaments. En dehors des cellules, on rencontre également des spores rouges en grand nombre, et plus rarement des spores bleues, des bacilles et des filaments assez longs.

Au bout de 24 heures, le nombre de filaments et bacilles libres a notablement diminué ; par places, on trouve des cellules littéralement boudées de spores rouges. Les filaments et les bacilles sont bien colorés en bleu. Plus tard le sort des spores est le même que chez les poules.

Chez le pigeon qui a succombé au charbon, on trouvait encore, 23 heures après l'introduction du fil chargé de spores, un petit nombre de leucocytes contenant des spores, mais l'accumulation des leucocytes était faible. On voyait également des spores libres, des filaments à 4 ou 5 articles, quelquefois plus longs jusqu'à 10 articles.

Plus tard il s'est formé au point d'inoculation de la tumé-

1. Contribution à l'étude de l'immunité contre le charbon. *Centralbl. f. Bact.*, 1891.

faction et de l'œdème; à l'autopsie on trouva une hypertrophie considérable du foie et de la rate. Le sang et les organes donnaient des bacilles du charbon.

Ces expériences montrent que chez le pigeon jouissant de l'immunité, les spores du charbon se développent, et qu'un grand nombre de spores, transformées ou non, de bacilles et de filaments est saisi par les leucocytes. Chez le pigeon qui a succombé au charbon, il existait également une accumulation de leucocytes, mais cette dernière était faible. Metchnikoff [1] et Hess [2] ont insisté dans leurs travaux sur l'importance de la phagocytose au point de vue de l'immunité du pigeon, et le premier de ces auteurs a constaté le développement des spores du charbon dans la chambre antérieure de l'œil et sous la peau des pigeons. Savtchenko (*l. c.*) admet que la section de la moelle épinière rend le pigeon apte à l'infection charbonneuse. Netchaïeff est d'avis que ce n'est qu'exceptionnellement qu'on trouve des bactéries dans les leucocytes chez le pigeon, et Czaplewsky va encore plus loin en niant toute influence des cellules sur l'immunité du pigeon. Lubarsch a constaté le développement des spores dans l'organisme des pigeons (*l. c.*, p. 103).

Canalis et Morpurgo (*l. c.*) rendaient les pigeons aptes à contracter le charbon en les soumettant à l'inanition; mais si les pigeons infectés étaient bien nourris avant d'être soumis à l'inanition, ils succombaient aux résultats de l'inanition, mais non pas au charbon. Ils ont en même temps constaté que les spores du charbon conservent pendant longtemps leur vitalité et leur virulence.

Mes expériences confirment les observations de Metchnikoff et Hess, et contredisent les conclusions de Czaplewsky et Netchaïeff. Le développement des spores dans l'organisme du pigeon réfractaire, et leur transformation consécutive en bacilles et filaments longs, montrent d'une façon très nette que, contrairement à l'avis de M. Savtchenko, l'organisme du pigeon ne présente nullement un milieu impropre ou non favorable au développement des bactéridies charbonneuses.

Rats gris. Le rat gris étant considéré par quelques savants

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, t. IV, n° 2, 1890.
2. *Virchow's Arch.*, 1887, t. CIX, p. 379, 380.

comme absolument réfractaire au charbon, j'avais projeté sur lui une série d'expériences que j'ai été obligé de réduire à une seule. J'ai introduit dans la chambre antérieure de l'œil d'un rat gris, des spores charbonneuses provenant d'une culture et restées six mois dans l'eau distillée.

Dans le liquide pris dans l'œil malade 17 heures après l'inoculation, on trouvait un petit nombre de spores rouges libres, et beaucoup de bacilles courts, gros, avec la gaine colorée, et de bacilles minces, à gaine transparente et incolore. Les cellules étaient rares.

Après 24 heures, l'aspect était le même, mais le nombre des filaments avait augmenté. Le rat était très faible et a succombé au charbon moins de 36 heures après l'infection. Les spores du charbon se développent donc, même dans un organisme réputé réfractaire, et ceci confirme les expérience de Savtchenko qui voit périr les rats gris adultes inoculés avec des cultures rendues virulentes par passage au travers de l'organisme d'un rat gris jeune.

En résumé, chez tous les animaux qui m'ont servi pour mes expériences, et qui jouissent d'une immunité naturelle, les spores se développaient et se transformaient en bacilles et en filaments, qui quelquefois amenaient la mort de l'animal inoculé. L'organisme de ces animaux ne constitue donc nullement un milieu impropre au développement des bacilles charbonneux. Aussi est-il impossible d'accepter l'opinion de quelques savants (Lubarsch) qui ne reconnaissent pour réfractaires que les animaux dans lesquels le développement des spores n'a jamais lieu. Il n'y aurait pas alors d'animaux vertébrés jouissant de l'immunité contre le charbon.

VIII

Parmi les animaux jouissant d'une immunité artificielle, j'ai pris le lapin pour y étudier le sort des spores ; j'ai choisi des animaux [1] ayant résisté à des infections multipliées avec des

1. Un de mes lapins, donné par M. le Dr Malm, a résisté aux injections suivantes : 1° 24 *janvier* 1890 : inoculation du 1er vaccin charbonneux ; 2° 30 *janvier :* 2e inoculation du même vaccin ; 3° 7 *février :* inoculation du second vaccin ; 4° 21 *février :* inoculation d'une culture virulente ayant tué un cobaye en 36 heures et un lapin en 80 heures ; 5° 4 *mars :* introduction de 2 fils chargés de spores de charbon ayant

cultures charbonneuses très virulentes, et dont l'état réfractaire était par conséquent hors de doute.

Vingt ou 24 heures après l'introduction sous la peau d'une culture ne contenant que des spores charbonneuses, on voit apparaître au point d'inoculation de la rougeur, une tuméfaction ressemblant à un abcès rempli de pus épais : les vaisseaux voisins sont dilatés, mais le lapin semble se bien porter.

Sur des préparations faites 3 ou 4 heures après l'infection, on voit une accumulation considérable de leucocytes, des spores libres et colorées en rouge dans la lymphe, un petit nombre de spores bleues, des bacilles et des filaments. Après 24 heures, on trouvait toujours des leucocytes, dont quelques-uns contenaient en grand nombre des spores rouges. Les spores libres étaient rares, mais, par places, on trouvait encore des groupes de spores libres au milieu desquelles on voyait des bacilles. Un grand nombre de cellules ne contenaient pas de spores. Les spores bleues paraissaient dans certains cas tuméfiées, et présentaient une capsule distincte (tuméfaction de l'endosporium.)

Au bout de 48 heures, on trouve encore des cellules, quelquefois en grand nombre, renfermant des spores rouges. Les spores bleues et les bacilles ne se rencontrent plus sur toutes les préparations.

Il résulte de là que, chez le lapin jouissant de l'immunité, il se fait une germination des spores, mais ce développement est faible, peu marqué et plus difficile à observer que chez les grenouilles. Si les spores sont introduites profondément sous la peau, elles sont rapidement emportées et deviennent difficiles à trouver, même au point d'inoculation. Si elles sont introduites dans une sorte de petite poche creusée dans le tissu cellulaire sous-cutané du lapin, elles restent plus longtemps au point d'inoculation, et il est plus facile de suivre leur développement et leur transformation.

tué un lapin en 50 heures ; 6° 25 *mars:* inoculation sous-cutanée d'une certaine quantité de sang de chien mort du charbon le même jour. Ce sang a tué un cobaye et un chien en 30 heures; 7° 1er *avril :* injection dans la veine de 0,5 c.c. de sang d'un chien mort du charbon; un lapin inoculé avec ce sang meurt en 8 heures; 8° 4 *avril:* inoculation sous la peau d'une culture fraîche provenant du sang d'un chien mort du charbon.

IX

Pour étudier les phénomènes locaux qui accompagnent l'introduction des spores pathogènes dans l'organisme des animaux non réfractaires, et pour voir s'il existe une réaction, une lutte de l'organisme contre elles, j'ai fait un certain nombre d'essais sur des lapins et des cobayes.

Comme dans les expériences précédentes, je me suis servi de spores charbonneuses, que j'introduisais sous la peau de l'oreille des animaux. Ici il ne pouvait y avoir de doute sur la question de savoir si les spores se développent, si les milieux de l'organisme ont, ou non, des propriétés bactéricides. La mort de l'animal, survenant régulièrement après l'infection, répondait à ces questions, mais ce qui était intéressant, c'était de savoir comment les éléments cellulaires de ces animaux se comportaient à l'égard des spores.

Quatre heures après l'injection, on voyait chez le lapin apparaître, au point d'inoculation, une légère hypérémie et une tuméfaction à peine appréciable, de sorte que la réaction inflammatoire locale paraissait à peine exister. Sur les préparations de lymphe, on voyait un grand nombre de spores non germées et colorées en rouge, des bacilles et des filaments à 2-5 articles, peu nombreux ; les leucocytes n'étaient guère plus nombreux, mais quelques-uns renfermaient déjà plusieurs spores et bacilles ; par place on trouvait des leucocytes renfermant un grand nombre de spores.

Au bout de 26 heures, on trouve toujours un grand nombre de spores rouges et des filaments libres, mais les leucocytes restent en petit nombre. Au bout de 45 heures, on ne trouvait plus, sur certaines préparations, ni bacilles ni spores, et le nombre des cellules avait encore notablement diminué.

L'animal a succombé au charbon 84 heures après l'infection.

Nuttall (*l. c.*) qui injectait sous la peau des lapins des cultures de charbon renfermant des spores, observait 20, 30 et 45 heures après l'infection les phénomènes suivants : œdème suivi de suppuration au point d'inoculation, grand nombre de bacilles et filaments libres, leucocytes peu nombreux, et phénomènes

de phagocytose très rares. Au début on voyait des bacilles bien colorés qui dégénéraient plus tard, bien qu'ils fussent libres et situés en dehors des leucocytes.

Dans un autre cas, il a vu se former, 20 heures après l'infection, un exsudat riche en leucocytes dont quelques-uns renfermaient des bacilles dégénérés. Au bout de 30 heures, il y avait un grand nombre de bacilles normaux, et peu de leucocytes; ces derniers ne contenaient plus de bacilles. L'animal a succombé au charbon 48 à 50 heures après l'infection.

Sur des préparations de lymphe prise au point d'inoculation après la mort de l'animal, et provenant d'un de nos lapins mort 48 heures après l'infection (injection des spores sous la peau de l'oreille), on voyait des spores rouges contenues dans des leucocytes, et un petit nombre de bacilles.

On voit donc que chez les animaux non réfractaires, les spores et les bacilles du charbon sont saisis par les leucocytes; seulement, la phagocytose chez ces animaux étant peu intense, les spores ont le temps de germer, de se transformer en bacilles, et finissent par tuer l'animal. L'organisme de ces animaux lutte contre l'infection, mais la lutte est faible et se termine au profit des agents infectieux.

Chez les cobayes inoculés sous la peau avec des spores du charbon, on observe les mêmes phénomènes que chez les lapins.

En introduisant sous la peau d'une patte une certaine quantité de spores provenant d'une culture sur gélose, délayée dans une petite quantité d'eau, et un fil chargé de spores sous la peau de l'autre patte, on voyait déjà, sur les préparations faites 3 heures après l'injection, et colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, un grand nombre de spores libres colorées très nettement en rouge, des bacilles et des filaments à 3-5 articles. Les leucocytes n'étaient pas nombreux, mais un grand nombre d'entre eux renfermaient des spores, quelquefois en quantité considérable; les bacilles étaient rares dans les cellules.

Au bout de 24 heures, le tableau est notablement changé : sur les préparations, on trouve un nombre considérable de bacilles, de filaments longs ou courts; par place on rencontre des spores bleues ou rouges, dont le nombre a notablement diminué. Les leucocytes, peu nombreux et ordinairement à plusieurs noyaux, renferment des bacilles et des spores rouges. On

voit que la plupart des spores a eu le temps de se développer et de se transformer, de sorte que la lutte devient impossible pour le petit nombre de leucocytes. 36 à 40 heures après l'infection, le cobaye fut trouvé mort.

Le sang et les organes de l'animal contenaient des bacilles ; dans le liquide de l'œdème développé au point d'inoculation des spores, on a trouvé des bacilles et des filaments courts. Sur les préparations faites avec le point où fut introduit le fil chargé de spores, à côté des filaments libres, on trouvait encore des spores rouges libres et des leucocytes renfermant un grand nombre de spores. Ce dernier fait prouve qu'un certain nombre de spores ne germent pas, non seulement dans l'organisme des animaux jouissant de l'immunité, mais aussi dans celui des animaux non réfractaires. Comme chez les lapins, l'organisme du cobaye réagit aussi contre l'infection : il y a lutte entre l'organisme et les microbes pathogènes, mais cette lutte n'est pas énergique et la victoire reste aux agents infectieux; l'animal succombe. Chez les animaux non réfractaires, on n'observe pas une accumulation aussi grande de leucocytes, et une phagocytose aussi intense que chez les animaux jouissant de l'immunité.

Malgré la sensibilité excessive des lapins envers le charbon, qui les tue très rapidement, Peckelharing affirme, en se basant sur ses expériences d'introduction de spores charbonneuses entourées d'un sac de parchemin sous la peau des lapins non réfractaires, que, sous l'influence des liquides du tissu cellulaire sous-cutané, les spores périssent relativement assez vite, environ 11 jours après l'inoculation. J'ai refait ces expériences plusieurs fois avec des résultats absolument contraires à ceux de Peckelharing, en ce sens que sur 13 lapins, 3 seulement ont survécu, tandis que les 10 autres ont succombé au charbon. Les spores qui sont restées dans le sac en parchemin, sous la peau du lapin, même pendant 45 jours, ont parfaitement conservé leur vitalité et leur faculté de germination ; dans un cas, ces spores, inoculées à une souris blanche, n'ont pas tué l'animal; mais dans les autres cas, les spores ont conservé leur vitalité et en même temps leur virulence.

Mes expériences étaient conduites de la façon suivante : Pour ces inoculations, je me servais soit d'un fil trempé dans une culture de charbon contenant des spores, fil desséché dans

l'étuve et préparé depuis le mois de mai 1890, ou bien d'un fil fraîchement préparé ; dans d'autres cas, je prenais, avec l'anse de platine, des spores fraîches d'un culture sur gélose, que je plaçais directement dans le sac en parchemin ; dans d'autres cas encore je mettais dans le sac une petite quantité de gélose avec les spores qui y poussaient. Dans aucun cas les spores n'étaient accompagnées de bacilles.

De son côté, le sac en parchemin était préparé en roulant plusieurs feuilles très minces de parchemin végétal, lavé à l'eau bouillante, en forme de tube dont un bout était ensuite fortement serré et lié avec un fil de soie solide. Le tube ainsi préparé et la soie destinée à la ligature du bout supérieur étaient ensuite placés dans un autoclave et stérilisés à 120°. On introduisait alors dans le sac le fil chargé de spores, et on liait l'extrémité supérieure avec le fil de soie stérilisé. Le sac chargé, dont les bouts avaient été rabattus aux ciseaux, était alors introduit sous la peau du lapin. Quand l'inoculation devait être faite avec des spores libres, ou un fragment de culture sur gélose, on plaçait les éléments virulents sur une bandelette de parchemin stérilisé, qu'on enroulait en tube au moyen d'une pince stérilisée, qu'on liait à ses deux extrémités au moyen de la même pince, qu'on introduisait ensuite sous la peau du lapin, soit telle quelle, soit en l'entourant d'un autre tube de parchemin, préparé comme nous l'avons dit plus haut.

La région de la peau où l'inoculation devait être faite était rasée et lavée avec une solution acidulée de sublimé au 1000e ; dans la grande majorité des cas, de crainte de pénétration du sublimé dans l'incision, ce qui aurait empêché le développement des spores, les lavages étaient faits d'abord avec de l'eau, ensuite avec de l'alcool absolu. Une fois la peau bien séchée, on faisait l'incision et on introduisait dans la plaie le sac en parchemin. La plaie était ensuite suturée, lavée à l'alcool et couverte d'une couche de collodion non iodoformé.

Les lapins inoculés de cette façon succombaient au charbon dans l'espace de 60 heures à 6 jours 1/2 après l'introduction du sac en parchemin. Dans tous les cas, les plaies sont restées propres, n'ont pas suppuré ; mais, lorsque le sac était resté longtemps sous la peau, on le trouvait couvert d'un dépôt fibrineux, et dans un cas où le sac était resté 45 jours, on le trouva

entouré d'un tissu cicatriciel. L'examen microscopique du contenu des sacs restés sous la peau était fait sans coloration préalable, ou bien les préparations étaient colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène. En plus, chaque fois que le sac était retiré, pendant la vie ou après la mort de l'animal, son contenu était ensemencé sur gélatine ou sur gélose dans des tubes ou dans les soucoupes de Petri.

Dans toutes ces expériences, les spores, après leur séjour sous la peau dans les sacs de parchemin, même les spores qui sont restées pendant 45 jours dans l'organisme de l'animal, se sont développées dans les soucoupes de Petri. Quant à la virulence de ces spores, on peut en juger par les faits suivants : un cobaye inoculé avec le contenu d'un sac resté 9 jours sous la peau du lapin est mort du charbon dans l'espace de 36 heures : un autre cobaye inoculé de la même façon avec le contenu d'un sac retiré au bout de 15 jours, a également succombé au charbon. Dans un cas seulement, le contenu d'un sac resté 45 jours sous la peau du lapin n'a pas tué le cobaye ni la souris blanche auxquels il fut inoculé.

Sur les préparations colorées faites avec le contenu du sac retiré pendant la vie des animaux, on ne voyait qu'une masse de spores non développées, bien colorées en rouge, mais on n'y trouvait pas de bacilles ni de filaments charbonneux. Sur la surface externe du sac, et entre les deux feuillets de parchemin quand le sac était double, on voyait quelquefois un grand nombre de leucocytes, dont quelques-uns contenaient des spores rouges et des spores bleues. Une fois on trouva à l'intérieur du sac un microcoque étranger et quelques leucocytes. Dans deux autres cas, les ensemencements ont donné des cultures pures du bacille du charbon ; dans un cas les spores avaient été introduites avec de la gélose dans le sac double ; dans l'autre les spores étaient portées sur un fil, le sac était simple, et la plaie ne fut pas lavée au sublimé.

Dans tous les autres cas, à côté d'un grand nombre de spores rouges non germées, on trouvait des bacilles et quelquefois une quantité considérable de filaments longs. Lorsque le lavage de la peau n'était pas fait avec le sublimé, on trouvait quelquefois des microcoques étrangers. Mais l'ensemencement donnait toujours lieu au développement de colonies nombreuses de charbon.

Parmi les animaux inoculés avec le contenu du sac qu'ils avaient eux-mêmes gardé, un seul a succombé au charbon 12 heures après l'inoculation du contenu, qui était resté dans le sac sous la peau pendant 6 jours. Sur une préparation faite avec les tissus de la poche qui renfermait le sac, immédiatement après qu'on a retiré ce sac, on trouva des bacilles. Il est très possible que l'animal serait resté vivant si le sac eût été laissé en place et si l'animal n'eût pas subi une autre inoculation sous la peau de l'oreille.

Le second lapin inoculé avec le contenu du sac resté sous sa peau pendant 9 jours, a survécu à cette inoculation, mais il a succombé plus tard à l'inoculation d'une culture virulente du charbon. 36 heures après l'injection. Un cobaye inoculé avec le contenu du sac du même lapin a succombé au charbon 38 heures après l'injection.

Le lapin qui a gardé le sac en parchemin pendant 15 jours a survécu à l'inoculation du contenu sous la peau de son oreille; mais un cobaye inoculé avec le même contenu a succombé au charbon au bout de 65 heures. Ce même lapin a été inoculé plus tard, à deux reprises, sous la peau de l'oreille, avec des cultures virulentes du charbon, mais a résisté à l'infection. Il avait donc acquis l'immunité contre le charbon; il est mort plus tard de cause accidentelle, 100 jours après l'introduction du sac et 40 jours après la seconde infection. Le dernier des lapins restés vivants après avoir gardé leur sac de parchemin pendant 45 jours, est mort 62 jours après l'expérience, sans que le charbon ait pu être incriminé. Un cobaye et une souris, inoculés avec les cultures provenant de l'ensemencement du sac entouré de tissu cicatriciel de ce lapin, ont survécu.

Ces expériences ne démontrent nullement que les liquides organiques d'un lapin jouissant de l'immunité, possèdent des propriétés sporicides. En restant sous la peau de l'animal, dans un sac de parchemin, même pendant 45 jours, les spores ont toujours conservé leur vitalité. Elles ont aussi conservé leur virulence, sauf dans un seul cas, évidemment insuffisant pour permettre de conclure aux propriétés sporicides des liquides organiques d'un animal aussi sensible au charbon que l'est le lapin.

Avant de recourir à cette explication des résultats de

M. Peckelharing, on peut se demander s'il n'y en aurait pas d'autres plus probables, l'influence de la privation d'oxygène par exemple, ou celle de l'acide sulfurique resté dans la trame du parchemin végétal, ou encore celle des lavages au sublimé tels que les faisait M. Peckelharing, ou encore la pénétration de microbes étrangers dans la plaie. On sait, par les recherches de M. Blagowestchensky [1], que les spores du charbon ne germent pas en présence du bacille pyocyanique, et il est probable qu'elles redoutent aussi le contact d'autres microbes. Quoi qu'il en soit, il y avait certainement une différence entre les dispositions expérimentales de M. Peckelharing et les miennes. Chez lui, les animaux ne mouraient pas; chez moi, malgré la solidité du sac et la ligature solide des deux bouts, les leucocytes y pénétraient et l'infection se manifestait. Il est vrai que dans quelques cas rares (surtout avec les sacs doubles ayant reçu des spores sur gélose), les spores ne se développaient pas, et qu'on ne trouvait ni leucocytes, ni bacilles. Mais ce qui prouve que ce non-développement n'était pas attribuable aux liquides organiques, c'est que, dans les autres expériences, les conditions étant les mêmes et les liquides organiques n'ayant pas changé, les spores se développaient très bien. Nous avons déjà vu du reste qu'elles se développent même chez les animaux jouissant de l'immunité.

X

Après avoir ainsi démontré que les spores pathogènes germent dans l'organisme des animaux, même de ceux qui jouissent de l'immunité, j'ai voulu voir s'il en est de même pour les spores des microorganismes notoirement non pathogènes.

A cet effet j'introduisais des spores du *Bacillus subtilis* et du *Bacillus megaterium* dans la chambre antérieure de l'œil du lapin, dans laquelle les spores d'autres microorganismes se développent très bien. Dans une autre série d'expériences, ces spores étaient introduites dans les veines des lapins et sous la peau des grenouilles. Pour ces expériences, je prenais des spores sans bacilles provenant de cultures sur gélose, ou bien des spores

1. Ces *Annales*, t. IV, p. 689.

ayant séjourné pendant quelque temps dans de l'eau distillée.

Sur les préparations faites avec le liquide de l'œil à divers intervalles après l'introduction des spores des deux espèces, et colorées à la fuchsine et au bleu de méthylène, on trouvait soit des spores colorées en rouge, soit une absence complète de spores; en tout cas, on ne trouvait pas de spores germées. On trouvait bien des leucocytes renfermant des spores, mais on ne voyait pas de bacilles ni de filaments. Ce fait permettait de supposer que les spores du *Bacillus subtilis* ou du *Bacillus megaterium* ne se développaient pas dans la chambre antérieure de l'œil. Pour voir si le liquide de la chambre antérieure de l'œil du lapin constitue un milieu propre à la germination des spores de ces deux bacilles, je prélevais de l'humeur aqueuse dans un tube et l'ensemençais avec des spores. L'ensemencement une fois fait, je plaçais le tube bouché avec un tampon d'ouate dans l'étuve à la température de 34-36°. Dans ces conditions les spores du *Bacillus subtilis* germent et donnent des bacilles, mais en petit nombre. J'ai fait alors, dans des lamelles concaves, des gouttes suspendues avec de l'humeur aqueuse ensemencée avec les spores du *Bacillus subtilis*. Après un séjour de 18 heures dans l'étuve, on trouvait déjà des bacilles mobiles, situés principalement vers les parties périphériques de la goutte. Au bout de 48 heures, le nombre de bacilles avait notablement augmenté ; vers la partie centrale de la goutte il y avait encore une grande quantité de spores non germées, tandis que, au pourtour, on trouvait à côté des bacilles un grand nombre de filaments formant des sortes d'îlots. Il est évident que les bacilles se portaient vers les parties où l'accès de l'air était facile. La même cause fait que les spores germent mal dans un tube effilé, mince, et que le développement ne se fait qu'au niveau des couches superficielles des liquides, les parties profondes contenant exclusivement des spores non développées. J'ai de même observé la germination des spores du *Bacillus megaterium*, et plus tard la sporulation des bacilles dans des gouttes suspendues d'humeur aqueuse, comme pour le *Bacillus subtilis*.

L'humeur aqueuse de l'œil du lapin est donc loin d'être un milieu impropre au développement des deux bacilles en question, et s'il ne se fait pas dans l'œil même, c'est peut-être à cause de l'absence de la quantité d'oxygène nécessaire.

J'ai pu confirmer les résultats de M. Wyssokowitch relatifs à la longue persistance des spores du *Bacillus subtilis* dans l'organisme des animaux. J'ai obtenu des ensemencements positifs avec des parcelles de reins et de rates de lapins tués 20 et 32 jours après inoculation du *Bacillus subtilis*, et avec la rate d'une grenouille tuée 64 jours après avoir reçu sous la peau une inoculation de spores de ce bacille. Par contre, je ne suis pas d'accord avec ce savant sur ce fait que ces spores seraient plus rapidement détruites dans le poumon que dans les autres organes. Après avoir introduit simultanément et en même quantité des spores de *Bacillus subtilis* dans la veine auriculaire et dans la trachée d'un lapin, j'ai tué l'animal par le chloroforme 24 jours après, et ensemencé ses organes sur gélatine sur des soucoupes de Petri. Le foie et le poumon ont donné une quantité énorme de colonies, sans différences bien sensibles entre les deux. Il y en avait bien moins avec la rate et le rein.

Les poumons, les reins, le foie, la rate des lapins sacrifiés 18 jours après l'introduction des spores du *B. megaterium* ont donné aussi des colonies nombreuses.

Introduites dans le sac lymphatique d'une grenouille conservée à la température ordinaire, ces spores ne germent pas, et sont saisies par les leucocytes qui, au bout de 18 heures, en contiennent déjà beaucoup. Au bout de 7 jours, il y a encore des leucocytes contenant beaucoup de spores qui se colorent en rouge.

Tout ceci montre que les spores des *B. subtilis* et *megaterium* ne germent pas dans l'organisme du lapin et de la grenouille, mais peuvent y conserver longtemps leur vitalité.

XI

De toutes ces recherches résultent les conclusions suivantes :

1° Il existe des faits qui démontrent que, dans certains cas, les cellules amiboïdes peuvent détruire, en se les incorporant, les spores pathogènes, et exercent sur elles une action sporicide ;

2° Les spores pathogènes que j'ai étudiées peuvent germer et donner des bacilles dans l'organisme des animaux réfractaires envahis, que ces animaux jouissent d'une immunité naturelle, ou d'une immunité acquise.

3° Immédiatement après la pénétration des spores des microbes pathogènes dans l'organisme des animaux réfractaires, commence une accumulation de leucocytes qui englobent les spores en question;

4° Les spores qui ont eu le temps de germer et de se transformer dans l'organisme de l'animal, les bacilles et les filaments sont également saisis par les leucocytes qui les détruisent;

5° Les spores saisies avant leur développement par les cellules ne se développent pas tant qu'elles se trouvent à l'intérieur des cellules, à la condition que ces dernières soient vivantes et non affaiblies;

6° Si, sous l'influence de certaines circonstances, le phagocyte s'affaiblit ou meurt, les spores vivantes qu'il a saisies germent et se transforment en bacilles et filaments;

7° Ces bacilles et ces filaments peuvent être ressaisis par les leucocytes et détruits;

8° Les spores renfermées dans les cellules sont transportées par ces dernières dans tous les organes de l'animal où elles peuvent se conserver très longtemps vivantes et virulentes;

9° Dans la majorité des cas, les cellules ne détruisent pas les spores du microbe pathogène, mais empêchent seulement leur développement;

10° Les liquides d'un organisme vivant ne possèdent pas de propriétés sporicides;

11° Toutes les spores ensemencées dans les milieux de culture ne se développent pas; il en est de même des spores pathogènes introduites dans un organisme vivant;

12° Les spores germent et donnent des bactéridies aussi bien dans la lymphe des grenouilles réfractaires chauffée à 34-37° que dans la lymphe non chauffée;

13° Les spores du charbon introduites sous la peau des grenouilles germent régulièrement quand même l'animal est maintenu à la température de la chambre (16 à 22°);

14° Lorsque les spores restent longtemps à une basse température dans l'organisme des grenouilles, elles ne se développent pas et sont saisies par les cellules; si on les place à une température suffisamment élevée, les spores ne germent plus, empêchées par des cellules qui les renferment;

15° Une première infection ne fait pas de l'organisme animal

un milieu impropre au développement des spores charbonneuses dans le cas d'une nouvelle infection. Dans ces conditions, les spores germent fort bien et l'animal peut succomber à la seconde infection.

16° Les spores des microbes pathogènes qui n'ont pas germé dans l'organisme y conservent longtemps leur vitalité;

17° Chez les animaux ne jouissant pas de l'immunité, les spores pathogènes sont également saisies par les leucocytes; seulement les phagocytes se trouvent en petit nombre, les spores germent, passent à l'état végétatif et amènent la mort de l'animal.

En terminant ce travail, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff pour ses conseils, et les indications précieuses qu'il m'a prodiguées tout le temps que j'ai travaillé sous sa direction.

EXPLICATION DES FIGURES.

PLANCHE X

Fig. 1. et 2. — Spores de Monospora bicuspidata enveloppées par des leucocytes.

Fig. 3 — Leucocyte de grenouille, 25 heures après l'injection des spores charbonneuses.

Fig. 4. — Leucocyte d'une grenouille, maintenue dans la chambre, 72 heures après l'injection des spores.

Fig. 5. — Bactéridies issues des spores dans la lymphe de la même grenouille.

Fig. 6 et 7. — Deux autres leucocytes de la même grenouille.

Fig. 8. — Un macrophage d'une grenouille maintenue à l'étuve, 43 heures après l'injection des spores charbonneuses.

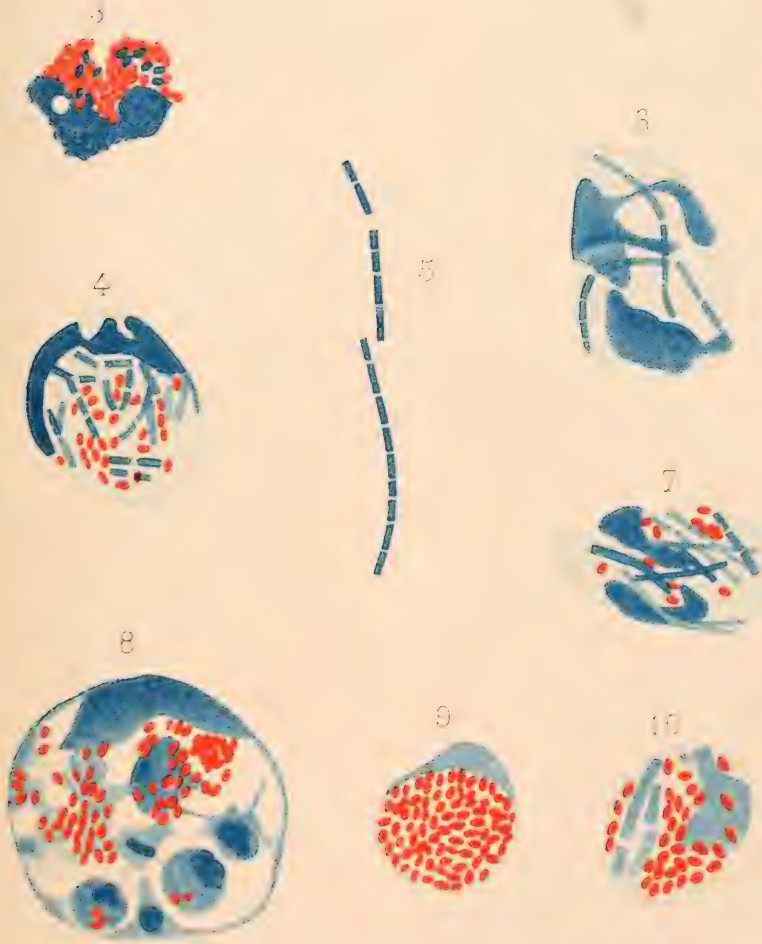
Fig. 9 et 10. — Deux leucocytes d'une poule 4 heures après l'injection des spores charbonneuses.

PLANCHE XI

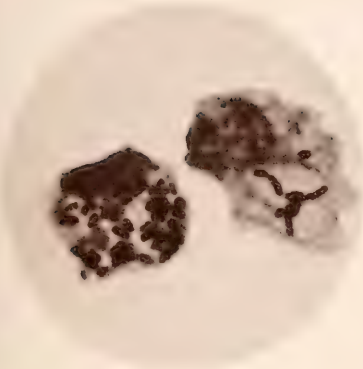
Fig. 1. — Deux leucocytes d'une grenouille renfermant des spores et des bâtonnets.

Fig. 2 et 3. — Lymphe d'une grenouille laissée à l'étuve. La lymphe a été retirée 18 heures après l'introduction des spores.

Fig. 4. — Leucocyte d'une grenouille renfermant des spores non germées dans la lymphe, puisée plusieurs jours après l'infection.

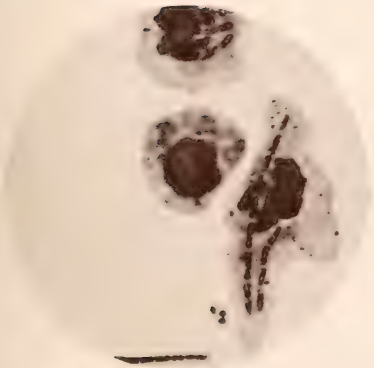

3
4
5
6
7
8
9
10

1

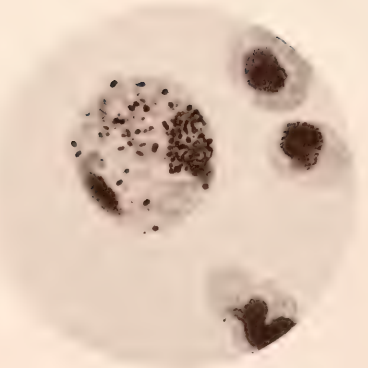


2

3



4



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE

DES LEVURES ALCOOLIQUES DU LACTOSE

PAR M. E. KAYSER.

(Travail du laboratoire de fermentations, à l'Institut agronomique.)

La première levure capable de faire subir au sucre de lait la fermentation alcoolique a été isolée et décrite par M. Duclaux dans ces *Annales* (1887, p. 573). Depuis, M. Adametz, à l'Institut agronomique de Vienne, en a étudié [1] une seconde, qu'il a jugée différente de la première, mais sans le prouver suffisamment. J'en ai retiré moi-même, d'un lait provenant d'une ferme de la Brie, une troisième, qui me semble ne se confondre avec aucune des deux autres [2]. Mais comme j'estime que ces questions de ressemblance et de différence sont de celles que ne saurait régler l'étude des formes et des dimensions du microbe, ou celle de ses cultures sur divers milieux, je me suis attaché à poursuivre la comparaison de ces trois levures sous toutes les faces que revêt leur vie physiologique, telle que nous la connaissons en ce moment. Pour les distinctions délicates auxquelles nous oblige la science dans le monde des microbes en général, et dans celui des levures en particulier, la morphologie ne suffit pas, et même la physiologie suffit à peine.

C'est donc une étude physiologique comparative de ces levures que je vais faire, et d'où ressortiront leurs ressemblances ou leurs différences. J'appellerai *a* celle de M. Adametz, *b* celle de M. Duclaux, *c* la mienne.

1. *Centralbl. f. Bact.*, t. V, 1889, p. 416. V. aussi ces *Annales*, t. III, p. 201.

2. Il y en a peut-être une quatrième, décrite récemment par M. Weigmann, de Kiel (sur la formation des trous et la soufflure des fromages, *Milchzeitung*, 1890, nº 38, p. 743), mais avec trop peu de détails pour qu'on puisse avoir une opinion

Elles ont ceci de commun que je n'y ai jamais observé la formation de spores, même après un mois de séjour dans l'eau distillée ou sur plâtre, aux températures de 5, 15 et 25 degrés.

La levure *a* (fig. 1) est formée de globules ovales, elliptiques, dont la longueur moyenne est de 7 à 10 μ, la largeur de 5 μ. Ils prennent quelquefois une forme sphérique et ont alors de 3 à 4 μ de diamètre. Cette levure donne souvent des bourgeons simultanés aux deux extrémités d'un même globule. Elle meurt à l'état humide vers 56°, mais à l'état sec elle peut être chauffée au delà de 100° sans périr[1].

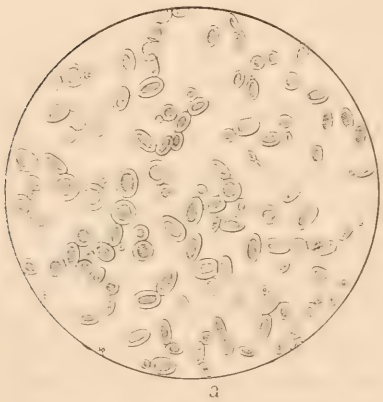


Fig. 1.

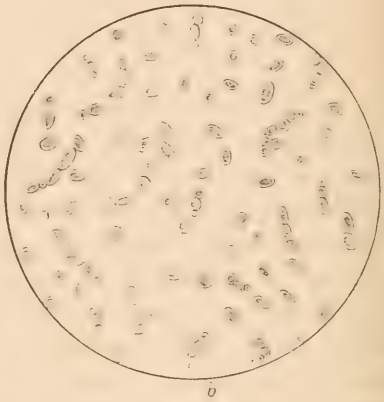


Fig. 2.

La levure *b* (fig. 2) est plus petite que la précédente, et ronde, surtout dans les milieux neutres ou un peu alcalins; les dimensions sont de 1 à 5 μ; elle bourgeonne à la façon des levures hautes, en donnant des paquets rameux. Elle meurt à 50° à l'état humide, et entre 50 et 60° à l'état sec. Elle est donc très peu résistante.

sur elle. On peut en dire de même pour la levure décrite par M. Grotenfeld, sous le nom de *Saccharomyces lactis acidi* (*Fortschr. d. Med.*, 1889, t. IV), et de celles décrites par M. Beyerinck sous les noms de *Saccharomyces Kefyr et tyrocola* (*Centralbl. f. Bact.*, 1889, t. II).

1. Comme dans mes précédents travaux, j'ai fait la dessiccation sur des spirales de platine, après avoir dilué dans de l'eau stérilisée la levure, que j'empruntais à une fermentation terminée. Ces spirales, qu'on laissait d'abord se dessécher avec lenteur, étaient ensuite portées à la température voulue et immergées ensuite dans du moût stérilisé.

La levure *c* (fig. 3) présente, comme la première, des globules ronds et elliptiques, mais elle est plus petite que *a* et plus grande que *b*. Les dimensions moyennes sont de 6 à 8 μ pour la longueur, de 3 à 5 μ pour la largeur. Elle meurt à l'état humide à 55°, et entre 90° et 100° à l'état sec.

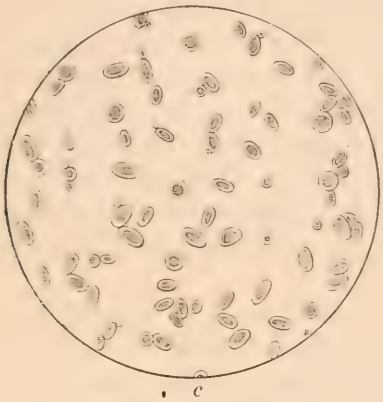


Fig. 3.

Sur gélatine, ces 3 levures se comportent sensiblement de la même manière et s'étendent en largeur plus que ne le font les levures de vin ou de bière; elles présentent, au centre de la colonie, une surélévation plus ou moins épaisse, et poussent sur les bords de fins rayons auréolés qui ont des aspects de mycélium. M. Adametz avait insisté sur ce caractère à propos de la levure *a*; je le retrouve très marqué aussi pour la levure *c*. Il est toujours un peu moins accusé avec la levure *b* qu'avec les deux autres.

Dans les milieux rendus acides, soit dès l'origine, soit par suite de la fermentation, la levure *b* conserve à peu près ses formes habituelles, mais les deux autres deviennent rameuses, surtout si l'acidité est notable. Le fait est surtout marqué pour la levure *a* dans l'acide oxalique, et pour la levure *c* dans l'acide tartrique. Cette dernière devient aussi rameuse, et donne même de véritables arborescences quand elle est introduite à l'état jeune dans l'eau distillée. J'ai dit plus haut que dans ces conditions, et contrairement au cas des levures de bière, il ne se forme pas de spores.

Dans les milieux neutres et le lait, la fermentation exige, pour bien marcher, le concours de la chaleur et d'une aération suffisante. La température la plus favorable est de 25° à 30°. Quant à l'oxygène, M. Duclaux avait déjà remarqué que sa levure commençait une vie anaérobie à des degrés d'aération où les autres levures auraient brûlé une grande partie du sucre sans le faire fermenter, et qu'elle s'affaiblissait lorsqu'on la faisait passer de fermentation en fermentation, sans la laisser revenir au contact de l'air. Les autres se comportent de même.

Quant à la rapidité, c'est la levure *b* qui part en général la première, la levure *c* ne vient qu'en 3e ligne. Le sucre disparu se transforme en alcool. Le lait ne devient pas visqueux. Il ne se coagule pas. On trouve seulement au fond un fin dépôt de levure et de caséine grenue. La saveur est agréable et nettement alcoolique.

Pour comparer ces 3 levures, je les ai fait agir simultanément sur des solutions de sucres divers, lactose, saccharose, maltose, galactose, glucose, sucre interverti, additionnées de bouillon Liebig. La galactose et la glucose étaient des produits donnés comme purs dans le commerce, la maltose provenait de la maltoserie de Creil.

Les liquides fermentés, placés dans des ballons bouchés à la ouate pour laisser place à l'air nécessaire à la fermentation, ont été étudiés à la façon ordinaire. On a laissé de côté l'alcool, dont une partie s'était perdue par évaporation dans les conditions de l'expérience. Le sucre restant était dosé par la liqueur de Fehling ; l'acidité au moyen de l'eau de chaux, et évaluée en acide lactique.

Le tableau suivant donne pour chaque groupe d'expériences la quantité de sucre et d'acide dans la liqueur initiale, la quantité de sucre restant au moment où on a arrêté les fermentations, la quantité de sucre transformée pendant leur durée commune par les levures *a*, *b* et *c*, et éventuellement, pour la galactose et la maltose, par une levure *m* de bière, prise comme terme de comparaison avec les levures ordinaires des brasseries. Enfin, on y trouvera aussi les poids de levure produite, après dessiccation à 100°, et les quantités d'acide formées, évaluées en acide lactique. Tous les nombres sont rapportés au litre.

		Sucre restant.	Sucre disparu.	Levure produite.	Acidité.
Lactose 60gr,30 par litre.	*a*	25,60	34,70	0,510	1,520
	b	25,60	34,70	0,270	1,050
	c	21,40	38,90	0,450	1,790
Galactose 36gr,80 par litre acid. i nit. 0,300.	*a*	16,80	20,00	0,315	1,770
	b	1,67	35,13	0,480	1,100
	c	15,84	20,96	0,270	1,280
	m	20,80	16,00	0,370	0,790
Glucose 37gr,3 par litre, acid. init. 0,180.	*a*	2,34	34,96	0,590	2,030
	b	0,00	37,30	0,215	1,370
	c	0,00	37,30	0,485	1,740
Sucre interverti 56gr,80 par litre.	*a*	2,22	54,58	0,413	»
	b	3,25	53,55	0,240	»
	c	2,79	54,01	0,270	»
Maltose 98gr,3 par litre, acid. init. 0,600.	*a*	73,76	24,54	0,575	1,425
	b	73,12	25,18	0,395	1,480
	c	74,40	23,90	0,475	1,280
	m	6,84	91,46	0,735	1,830
Eau de malt 66gr,35 maltose par litre.	*a*	55,05	11,30	0,400	»
	b	53,35	13,00	0,307	»
	c	52,80	13,55	0,347	»
	m	8,55	57,80	1,946	»

Le premier fait qui frappe quand on consulte ce tableau est la distinction entre les levures de lactose et les levures ordinaires. On sait par les expériences de M. Duclaux que celles-ci ne font pas fermenter le sucre de lait, et le brûlent lentement. Dans les miennes, la levure *m* de bière fait aussi fermenter plus péniblement la galactose que les levures de sucre de lait. En revanche ces levures font fermenter très péniblement la maltose, dans laquelle la levure *m* donne au contraire une fermentation très active.

Vis-à-vis de la glucose, du sucre interverti, de la saccharose même, les levures étudiées se comportent comme vis-à-vis de la

lactose. Pour bien montrer leur quasi-indifférence entre la lactose et la saccharose, j'ai additionné deux échantillons de petit-lait, renfermant par litre 45 grammes de lactose, l'un de 50 grammes de saccharose, l'autre de 50 grammes de lactose environ par litre, et je les ai ensemencés simultanément avec les levures *b* et *c*. Au bout d'un même temps, j'ai trouvé que les résidus d'évaporation à 100° étaient exprimés par les chiffres suivants :

	b	*c*
Petit-lait + lactose	21,1	21,6
Petit-lait + saccharose	20,5	19,7

C'est-à-dire à très peu près les mêmes, et qu'il ne restait plus de sucre d'aucun côté. La saccharose avait donc été transformée aussi vite que la lactose.

Voici un autre mode de comparaison. J'ai ensemencé dans de l'eau de touraillons, additionnée de 60 grammes par litre de sucre ordinaire, une levure de *pale ale* et la levure *c* de lactose. L'analyse des liquides au bout du même temps a donné les résultats suivants :

	Liq. initiale.	Levure de bière.	Levure *c*.
Extrait	65,0	4,9	6,5
Sucre	58,4	0	0
Poids de levure	»	1,475	1,125
Acidité	0,270	1,830	2,020

Ainsi les sucres d'une levure ne sont pas les sucres d'une autre, et les prédilections diverses peuvent servir à créer des groupes naturels.

J'ai essayé de voir si ces levures qui font fermenter la lactose ne pourraient pas agir sur d'autres matières sucrées telles que mannite, perséite, raffinose, inosite, dulcite, dextrine, mélézitose, tréhalose et sorbine ; aucun de ces hydrates de carbone n'a donné lieu à une fermentation alcoolique, ce dont je me suis assuré en faisant la réaction de l'iodoforme.

Les levures de la lactose se comportent vis-à-vis de ces sucres comme la levure ordinaire vis-à-vis du sucre de lait ; elles les brûlent tout simplement sans produire de l'alcool.

J'ai observé cependant que dans la mannite, la dulcite, la

perséite, les globules devenaient difformes et s'allongeaient beaucoup ; la levure *a* a surtout montré de très belles ramifications.

Par contre dans la raffinose, l'inosite, la mélézitose, la dextrine, la tréhalose, les globules conservent, en général, leur forme normale ; dans la sorbine elles ont une tendance à prendre la forme sphérique et à grossir, tout en s'enflant démesurément.

Si nous arrivons maintenant à comparer les actions des diverses levures sur un même sucre, nous voyons qu'au point de vue du sucre qu'elles ont transformé dans le même temps, elles sont à peu près toutes trois au même niveau. Vis-à-vis de la galactose, la levure *b* a seule témoigné d'une activité plus grande ; mais ce fait étant isolé, il n'y a pas lieu d'insister pour le moment.

Le parallélisme ne persiste pas en ce qui concerne l'acidité. On voit que dans tous les sucres que ces levures font bien fermenter, la levure *b* produit moins d'acide que ses congénères, et plus que la levure *m* de bière dans la galactose. Les différences sont même très sensibles. Dans la maltose c'est l'inverse. C'est la levure *b* qui donne l'acidité la plus grande.

Quant aux poids de levure provenant de la fermentation de quantités approximativement égales de sucre, ils sont aussi assez différents, et on voit que sous ce point de vue, les trois levures se rangent dans l'ordre décroissant *a*, *c*, *b*. La seule exception est relative à la galactose, où *b* tient la tête. Mais c'est que le poids de galactose transformée est aussi plus grand. En dernière analyse, c'est *b* qui donne les poids de levure les plus faibles, et c'est là un fait à rapprocher de celui que nous avons relevé tout à l'heure au sujet de l'acidité. Il s'explique bien si l'on admet, comme l'a soutenu M. Duclaux, que la sécrétion de l'acide soit un phénomène de vie cellulaire, indépendant dans une certaine mesure de cet autre phénomène de vie cellulaire qui amène la transformation du sucre. Pour des quantités égales de sucre fermenté, ce sont les poids vivants les plus faibles qui doivent donner le moins d'acide.

Il est curieux de rapprocher aussi de ce fait cet autre que l'ordre des grandeurs décroissantes des cellules est le même : *a*, *c*, *b*. Les inégalités dans les dimensions des cellules de la même levure empêchent de pousser plus loin l'étude de la question, et de se demander si le rapport des poids de cellules nécessaires pour faire fermenter une même quantité de sucre est le même que le

rapport des cubes des dimensions homologues. S'il en était ainsi, cela prouverait que l'activité protoplasmique n'est pas la même partout, et que l'unité de matière active est la cellule et non l'unité de poids du protoplasma. Cette question vaut bien qu'on la vise en passant, lorsqu'on la rencontre sans la chercher.

Je n'ai pas étudié de près l'influence de température, à cause de la difficulté qu'il y a à la caractériser par des nombres. Je me suis contenté de constater que ces levures de lactose ne sont pas des levures basses, et ne s'accommodent pas du voisinage de 0°. A la cave à 5°, la fermentation a à peine commencé lorsqu'elle est terminée à l'étuve à 25°.

Une question plus intéressante, au double point de vue de la théorie et de la pratique, était de savoir quelle dose maximum d'acide et de sucre pouvaient supporter ces levures sans cesser de se développer. On pouvait en effet se demander s'il n'était pas possible de transformer avec elles en une liqueur alcoolique acceptable les quantités énormes de petit-lait que l'industrie des fromages produit annuellement, et de trouver ainsi pour ce liquide un mode d'emploi plus rémunérateur qu'aucun de ceux qui sont usités jusqu'ici. Ce sérum renferme en effet, outre son sucre de lait, un peu de matière grasse et des substances azotées et minérales de premier ordre pour l'alimentation. Mais il est d'ordinaire acide par suite d'un commencement de fermentation lactique. De plus il est pauvre en sucre, la quantité maximum d'alcool qu'on peut espérer y produire est de 2 à 3 °/₀ : il était intéressant de chercher à l'augmenter soit par des additions de lactose, soit au moyen de sucre ordinaire. A ce point de vue, l'étude des diverses levures de lactose s'imposait, et pouvait dans tous les cas nous fournir de nouveaux éléments de différenciation.

Pour étudier l'influence de l'acidité, j'ai préparé quatre liquides contenant par litre les mêmes quantités de sucre de lait ($53^{gr},51$) et de bouillon Liebig ($7^{gr},2$), mais dont les acidités étaient inégales, et représentées respectivement par $2^{gr},31$, $14^{gr},23$, $26^{gr},15$ et $38^{gr},80$ d'acide lactique par litre. J'y ai ensemencé mes trois levures, et voici ce qui restait de sucre dans les divers essais au bout de sept semaines d'étuve.

		1	2	3	4
		ac. 2gr, 31.	ac. 14gr, 23.	ac. 26gr, 15.	ac. 38gr, 80
Sucre restant	*a*	2gr,75	3gr,27	40gr,20	50gr,25
	b	2gr,82	17gr,05	45gr,80	53gr,00
	c	2gr,60	3gr,13	39gr,25	50gr,80

La levure *b* est donc la plus sensible à l'augmentation de l'acidité. Elle ne s'est pas du tout développée dans le liquide 4, tandis que les deux autres s'y étaient multipliées, mais à l'état de végétal cellulaire, et sans donner de fermentation. C'est la levure *c* qui semble supporter le mieux la présence des acides. Mais on voit qu'il ne faut guère dépasser pour elle et pour la levure *a* une dose de 1,5 0/0 d'acide lactique. Il est rare que le sérum de coagulation du lait, même dans la fabrication du fromage de Brie, manifeste une acidité s'élevant à ce chiffre.

Pour étudier de même l'influence d'une augmentation dans la quantité de sucre, j'ai additionné du petit-lait de lactose de façon à lui faire contenir 153,5 d'extrait par litre, dont 133,1 de lactose. J'ai ensemencé ce liquide avec les trois levures, et j'ai laissé la fermentation marcher jusqu'au moment où le dégagement visible de bulles a cessé. L'étude des liquides a donné les résultats suivants :

	a	*b*	*c*
Lactose restante.....	43gr,2	56gr,0	28gr,3
— disparue.....	89gr,9	77gr,1	104gr,8
Alcool en poids.....	39gr,64	31gr,72	44gr,32

Au lieu d'ajouter de la lactose au sérum, on pourrait le concentrer par évaporation de façon à augmenter sa richesse saccharine. Voici le résultat d'essais faits sur du sérum réduit à peu près au tiers, et contenant 143 gr. 6 d'extrait par litre, dont 92 gr. 5 de lactose. La fermentation a été interrompue au bout d'un mois.

	a	*b*	*c*
Lactose restante.....	37gr,4	24gr,9	22gr,4
— disparue.....	55gr,1	67gr,6	70gr,1
Acidité totale.....	4gr,38	4gr,05	4gr,28
Acidité volatile.....	1gr,84	1gr,64	1gr,60
— fixe	2gr,54	2gr,41	2gr,68

On voit qu'au bout d'un mois, il y a environ 65 à 70 0/0 du sucre fermenté, ce qui correspond à 3,2 à 3 5 0/0 d'alcool. Je me

suis d'ailleurs assuré, par la méthode indiquée par M. Duclaux, que cet alcool est de l'alcool vinique à peu près pur.

On voit que dans ces essais, la levure *c* conserve sa prééminence; c'est aussi elle qui donne le moins d'acide volatil. Dans le tableau qui précède, toutes les acidités sont évaluées en acide lactique, mais les acides volatils sont uniquement formés d'acide acétique.

Au point de vue pratique, ces essais montrent qu'on peut obtenir facilement, au moyen du sérum de lait, des boissons contenant autant d'alcool que les bières les plus alcooliques, soit en opérant sur du petit lait concentré par évaporation, soit en ajoutant au sérum des fromageries du lactose ou de préférence des sucres ordinaires. Mais, quand on veut arriver à fabriquer une boisson courante nouvelle, il intervient des questions de saveur et de goût qu'il n'était pas dans le programme de ce travail d'examiner, mais dont j'ai voulu ébaucher l'étude.

Dans ce but j'ai ajouté de la lactose à du petit lait de façon à élever la quantité de sucre à 87 gr. 50 par litre. J'en ai concentré une autre partie par l'ébullition, de façon a arriver à 92 gr. 50 de sucre. Ces liquides ont été neutralisés, stérilisés ensuite à 120°, ce qui a précipité une partie des matières albuminoïdes, puis filtrés dans des bonbonnes qu'on venait de laver avec de l'eau passée au filtre Chamberland. Deux bonbonnes, l'une de petit lait sucré, l'autre de petit lait concentré, ont été mises en fermentation avec une culture pure de levure *c*. Dans une troisième bonbonne de petit lait sucré, on a ensemencé en même temps la levure *c* et le *Saccharomyces apiculatus*. La fermentation a commencé régulièrement partout. Au bout d'un mois, quand on l'a vue faiblir, on a mis le liquide en bouteilles, dans lesquelles la fermentation s'est réveillée et a continué. Un dégorgeage, fait à la mode champenoise, permet d'éliminer les levures qui se déposent bien, et d'obtenir des liquides qui restent mousseux. Voici l'analyse de ces liquides étudiés après un mois de bouteille.

	Petit-lait sucré		Petit-lait concentré
	levure *c*	levure *c* et *S. apiculatus*	levure *c*
Sucre restant	29, 24	11, 72	23, 65
Alcool en poids	28, 80	36, 80	30, 00
Acidité	1,35	1, 48	5, 98

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888, p. 489.

La majeure partie du sucre avait donc disparu, surtout dans le liquide ensemencé avec la levure *c* et le *S. apiculatus*. A la dégustation, le liquide des deux bonbonnes a été reconnu posséder une saveur fraîche, alcoolique et piquante, se rapprochant de celle du cidre. Le liquide provenant du sérum concentré par l'ébullition avait une saveur beaucoup trop saline, et je crois qu'il n'y a rien à chercher de ce côté; mais le sérum additionné de sucre peut donner une boisson saine, rafraîchissante et économique, car au prix d'évaluation actuel du petit-lait, l'addition de 30 grammes de sucre par litre n'élèverait pas à plus de 10 francs l'hectolitre la valeur de la boisson obtenue.

Il y aura à éviter la saveur de cuit que présente le petit-lait qu'on a chauffé pour le stériliser; cette stérilisation est indispensable si on veut que la levure de lactose prenne rapidement possession du liquide. Elle ne s'accommoderait pas d'un milieu déjà peuplé par des espèces plus vivaces. Mais si on laisse au sérum un peu d'acidité, ce qui ne peut être qu'utile, la stérilisation pourrait se faire au-dessous de 100°. Il y a là toute une pratique à étudier, et ce n'est pas dans un laboratoire de Paris qu'on peut le faire.

J'aurais même été assez embarrassé pour mes essais si M. P. de Monicault, ancien élève de l'Institut agronomique, et M. Baillière, propriétaire de la ferme du Paradis-en-Brie, ne m'avaient rendu le service de me procurer en quantité suffisante du sérum tout à fait *authentique*. J'ai plaisir à les remercier ici de leur obligeance.

REVUES ET ANALYSES

SUR LA DIGESTION DANS L'INTESTIN GRÊLE

REVUE CRITIQUE

EWALD, *Virchow's Archiv*, t. LXXV, 1878. — HARRIS et H. TOOTH, Relation des microbes avec la digestion pancréatique, *Journal of Physiology*, t. IX, p. 220. — SH. LEA, Études comparatives sur la digestion naturelle et artificielle, *Id.*, t. XI, p. 226. — A. MACFADYEN, M. NENCKI et N. SIEBER, Recherches sur les actions chimiques dans l'intestin grêle de l'homme, *Archiv. f. exp. Pathol.*, t. XXVIII.

Nous sommes revenus à plusieurs reprises, dans ces *Annales* (V. t. II, p. 613; t. III, pp. 126, 183), sur l'étude de la digestion stomacale. Nous profitons aujourd'hui du récent mémoire de Macfadyen, Nencki et Sieber pour parler de la digestion qui se fait dans l'intestin grêle. On sait peu de choses précises sur elle, bien qu'elle ait été très étudiée. Ce qu'on trouve en gros à son sujet, dans les livres élémentaires, c'est que le suc pancréatique et la bile, tous deux à réaction alcaline, saturent l'acidité du chyme en se mélangeant avec lui, amènent par là la précipitation de quelques-uns des éléments albuminoïdes qui s'y trouvaient dissous, et reprennent en sous-œuvre, en lui donnant une autre direction, le travail de dissolution commencé par l'estomac.

Si on veut préciser davantage, on tombe dans des questions de nomenclature des diverses matières albuminoïdes en voie de digestion, questions que je ne veux pas aborder aujourd'hui, d'abord parce qu'elles sont des plus confuses, ensuite parce qu'elles sont inutiles pour le sujet que je voudrais traiter. MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont en effet réussi à les éliminer, grâce à une circonstance très heureuse pour l'étude. Ils ont eu l'occasion de pouvoir observer une malade portant, à la suite d'une opération chirurgicale, une fistule placée au confluent de l'iléon et du cœcum. Cette fistule donnait issue à la masse alimentaire tout entière, après qu'elle avait subi, dans des conditions en apparence tout à fait normales, l'action de l'estomac et celle de l'intestin grêle tout entier. On pouvait donc, en profitant de ce que l'action de l'estomac est la mieux connue des actions digestives,

faire la part de ce qui revient à l'intestin grêle dans le procès général. Mais, ce qui est plus intéressant, on pouvait, en soumettant la malade à un régime régulier, et en recueillant par la fistule la totalité de la matière alimentaire non digérée, mesurer la proportion d'éléments absorbés dans l'estomac et l'intestin grêle, et la proportion réservée au travail dans le gros intestin.

Ces chiffres sont évidemment des plus intéressants, parce qu'ils sont indépendants de toutes les questions douteuses d'interprétation que nous rappelions tout à l'heure. Tous les aliments et les éléments ingérés qui manquent dans la masse évacuée par la fistule sont bien absorbés et digérés au sens habituel de ce dernier mot. Rien n'empêche du reste, et les auteurs du mémoire dont je parle n'y ont pas manqué, de rechercher ce qu'il y a, dans cette masse, de sucre, d'albumine précipitable par la chaleur, etc., de voir comment ces quantités varient avec le mode d'alimentation. Mais nous sommes encore si maladroits dans l'analyse immédiate de ces masses complexes, que tous ces résultats, si intéressants qu'ils soient, auront un poids moindre que ceux de l'analyse élémentaire, et, bien que ceux-ci soient en quelque sorte placés au second plan dans le travail de MM. Macfadyen, Nencki et Sieber, je demande à les mettre au premier.

Le régime journalier de la malade était le suivant :

Pain	260gr	avec 2gr,6	d'azote ou	16gr,2	mat. albumin.
Viande	100	3gr,33	—	20gr,8	—
Bouillie de gruau	200	0gr,51	—	3gr,2	—
2 œufs	100	2gr,0	—	12gr,5	—
Peptone	20	1gr,52	—	9gr,6	—
Lait	100	0gr,55	—	3gr,4	—
Bouillon	1,050	0gr,09	—	5gr,0	—
	En tout	10gr,60	d'azote ou	70gr,7	de mat. albumin.

Je laisse de côté les boissons, vin, thé et café, qui ne changeraient pas beaucoup le total, et qui d'ailleurs sont considérées comme ne contenant que des matières directement assimilables.

Le séjour des aliments dans le canal intestinal était de durée assez variable. Pour s'en faire une idée, on mélangeait à la masse alimentaire des pois verts cuits, mais non broyés, et on surveillait le moment où on les voyait reparaître à la fistule. Dans un cas, les premiers ont reparu après 2 heures 1/2, et les derniers après 14 heures. Dans une seconde expérience, les nombres ont été 5 heures 1/4 pour les premiers, 23 heures pour les derniers. On a aussi employé comme moyen d'épreuve le salol, que l'on retrouve dans l'intestin à l'état d'acide salicylique. Pour mettre ce dernier en évidence, on filtre les liquides recueillis à divers intervalles par la fistule, on ajoute au liquide filtré

quelques gouttes d'acide chlorhydrique, on traite par l'éther, qu'on laisse évaporer, et dont le résidu est essayé avec une goutte de perchlorure de fer. On a ainsi trouvé que l'évacuation du salol a duré dans un cas 14 heures, dans l'autre 9 heures seulement.

Comme la malade, restée six mois en observation, a été soumise pendant deux mois à une étude journalière, on pouvait recueillir assez de documents pour comparer, au point de vue pondéral, les matières sorties par la fistule aux matières ingérées.

La matière qui s'écoulait par un tube de caoutchouc inséré dans la fistule et qui se réunissait, sans que la malade eût conscience de l'évacuation, dans des flacons tarés, était de consistance plus ou moins épaisse, n'ayant qu'une odeur faible d'acides gras, parfois d'indol, et contenant de 5 à 10 % de matières solides. En moyenne, la quantité évacuée en 24 heures, lorsqu'elle était la plus fluide, était, pour le régime indiqué tout à l'heure, de 550 grammes avec 4,9 % de résidu solide; lorsqu'elle était le plus compacte, de 232 grammes avec 11,23 % de résidu sec. En moyenne, il sortait donc par la fistule 26gr,5 de matière, contenant 1gr,61 d'azote ou 10,06 de matières albuminoïdes.

« Comme la malade en recevait journellement 70gr,7 par jour, il en résulte qu'il n'y en avait que un septième ou environ 14,25 % réservé à la digestion et à l'absorption dans le gros intestin, pendant que 85,75 % avaient été résorbés dans l'estomac et l'intestin grêle. »

Je ne vois pas bien pourquoi les auteurs du mémoire ne tirent cette conclusion que pour l'azote. Ils auraient pu l'étendre au carbone et à l'hydrogène, en faisant des analyses élémentaires de ces deux éléments. On n'en trouve qu'une dans le mémoire et peut-être ont-ils eu peur que cela ne semblât trop peu. Mais ils auraient au moins pu prendre les aliments en bloc. Il est facile de calculer, avec les tables de calcul des rations, que le régime alimentaire de la malade comprenait journellement 300 grammes environ de matière sèche. Comme il n'en sortait que 26gr,5 environ par la fistule, on voit que l'absorption totale était encore plus grande que pour l'azote, et que par conséquent l'absorption des aliments gras et hydrocarbonés, au travers de l'estomac et de l'intestin, était encore plus active que celle des aliments azotés. En somme, pour la malade en question, un septième seulement des aliments azotés, et un quatorzième environ des aliments non azotés était réservé à l'absorption dans le gros intestin.

On se demande naturellement alors quelle eût été l'action du gros intestin de la malade, sur ce faible résidu, s'élevant en moyenne de 8 à 9 % de la matière alimentaire ingérée. On compte qu'un homme en bonne santé, ayant une nourriture variée, évacue chaque jour de 120 à 150gr d'excréments, contenant de 30 à 37 grammes de matière solide pour environ 600 grammes de matière alimentaire sèche; c'est une

proportion de 5 à 6 %. L'action du gros intestin paraît donc négligeable, et cette conclusion semble un peu surprenante, en présence de l'énorme développement de cette partie du canal digestif comparativement avec les autres.

Cette conclusion présente de l'importance à un autre point de vue, au sujet de la part que prennent les microbes dans la digestion. On m'a reproché, dans certains mémoires insuffisamment documentés, d'avoir dit que sans les microbes la digestion serait impossible; je n'ai jamais soutenu d'opinion pareille. J'ai insisté sur ce fait qu'il n'y avait peut-être jamais eu d'expérience de digestion artificielle, sans que leurs résultats aient été troublés, plus ou moins, par l'intervention des microbes; j'ai dit que c'étaient surtout les digestions pancréatiques artificielles qui restaient sujettes à caution; j'ai dit aussi que la digestion de la cellulose me semblait seule une pure affaire de microbes, et qu'il en était de même de la digestion dans le gros intestin, où je n'avais pu trouver aucune diastase active qui ne pût être attribuée aux microbes qui l'habitent. J'ai ajouté que, en suite de quelques essais trop imparfaits pour que je me crusse autorisé à les publier, la moitié environ de la digestion totale me semblait attribuable aux actions microbiennes; mais au lieu de nier l'action des sucs normaux de l'organisme, j'ai cherché au contraire à la préciser, en indiquant à quelle espèce de substances alimentaires chacun d'eux avait pour mission de s'attaquer.

Le digestion stomacale incombe en entier ou à peu près au suc gastrique, du moins en ce qui concerne les matières albuminoïdes. Celles-ci sont en effet, comme l'ont révélé mes premières études sur le lait, très difficilement attaquables par les microbes en milieux acides. Ces milieux acides sont au contraire très favorables à l'attaque des substances hydrocarbonées, telles que les sucres. Il ne faut pourtant pas que l'acidité soit trop forte, et dans l'estomac les seules actions microbiennes un peu actives sont la fermentation des jus sucrés sous l'influence des levures, et un commencement d'attaque des mêmes sucres, surtout du sucre de lait, par le ferment lactique. D'ordinaire la résorption de ces matières très solubles se fait sans qu'elles aient eu le temps de subir une fermentation complète, et cela est bien heureux, surtout pour les fermentations acides, car ni les parois de l'estomac ni de l'intestin grêle ne semblent se prêter facilement à la résorption de leurs produits. Les selles de la malade de MM. Macfadyen, Nencki et Sieber étaient surtout diarrhéiques lorsquelles étaient très acides, et on sait que, chez les enfants, un lait déjà envahi par les ferments lactiques amène souvent des irritations du tube digestif, que combat et arrête l'usage exclusif du lait stérilisé.

Les arrivées successives de la bile et du suc pancréatique dimi-

nuent l'acidité du chyme, et on admet même généralement qu'elles le font disparaître. Il n'en est pourtant rien. Tiedemann et Gmelin avaient confirmé l'observation de Prévost et Le Royer que, chez les ruminants, la réaction de l'intestin grêle était acide jusqu'à l'entrée dans l'iléon. Meissner avait constaté le même fait sur les carnivores, et Ewald, chez une malade affligée d'une fistule qui s'ouvrait, suivant toute apparence, à la partie postérieure de l'intestin grêle, avait vu que la réaction du contenu était neutre ou légèrement acide, mais jamais alcaline. MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont observé le même fait chez leur malade. En six mois d'observation ils n'ont trouvé qu'une fois la réaction neutre à la fistule, c'était après une ration de purée de pois. Toujours elle se montrait acide, et l'acidité, qui était en moyenne de un pour mille, calculée en acide acétique, s'est élevée une fois à 2 pour mille.

Ceci témoigne que l'action pancréatique s'accomplit le plus souvent en milieu acide, et c'est là un fait dont il faut tenir compte dans les expériences de digestion artificielle au moyen de ce suc. Mais avant d'en tirer une conclusion au point de vue de la physiologie de la digestion, il faut chercher d'où provient cette acidité, c'est-à-dire si elle est normale ou microbienne.

MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ne se prononcent pas formellement sur ce point, mais on peut pourtant trouver dans leur mémoire quelques faits permettant de se faire une opinion. Ils disent, par exemple, que l'acidité de la masse en digestion est surtout due à des acides organiques, et en particulier à de l'acide acétique. Aucun réactif, violet de méthyle, réactif de Gunzbourg, n'a pu réussir à mettre en évidence la présence de l'acide chlorhydrique libre. D'un autre côté, on sait que la sécrétion de l'intestin grêle est rendue alcaline par du carbonate de soude; la réaction de la muqueuse du côlon, chez la malade étudiée, était souvent alcaline lorsque la masse en contact était acide. Pour expliquer ce fait, on ne peut guère invoquer la difficile imprégnation de la masse intestinale par les liquides sécrétés par les parois. En présence de cette sécrétion continue d'alcali, il n'y a à invoquer, comme explication du maintien de l'acidité dans la masse, qu'une production continue d'acides, et comme ces acides, quels qu'ils soient, sont de ceux qu'aucune diastase ne crée, et qui sont nécessairement des produits microbiens, il faut bien qu'il y ait une digestion microbienne plus ou moins intense dans l'intestin grêle, aussitôt que l'hyperacidité du chyme a disparu.

La bile, comme l'a montré en effet M. Macfadyen, n'est nullement un antiseptique. De plus, en cherchant par la méthode des plaques quels sont les microbes le plus fréquemment présents dans les matières qui s'écoulaient par la fistule, MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont surtout trouvé des ferments des matières hydrocarbonées. Cette partie

de leur mémoire, très développée, est impossible à résumer ici. Nous devons pourtant faire mention des propriétés de quelques-uns des microbes qu'ils ont isolés et étudiés.

La nature de ces microbes variait avec le mode d'alimentation, et elle vient à l'appui de cette proposition, sur laquelle j'ai si souvent insisté, qu'il y a digestion et digestion, et qu'on fait fausse route en traitant ce phénomène comme un phénomène unique. Parmi ceux qui ont été le plus souvent retrouvés, on en a isolé 7 que voici :

1° Bacille court, analogue au *Bact. coli commune*, immobile comme lui, donnant comme lui avec le sucre de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide lactique, mais en différant en ce qu'il donne de l'acide lactique inactif, tandis que le *Bact. coli commune* donne de l'acide lactique droit. L'un et l'autre ne donnent rien avec les matières albuminoïdes;

2° Un streptococcus, appelé S. *liquefaciens ilei v. acidi lactici*, qui n'agit guère aussi que sur le sucre, en le transformant partiellement en acide lactique inactif;

3° Un bâtonnet court, à extrémités arrondies, peu mobile, qui ne s'attaque pas non plus à l'albumine, mais qui donne avec le sucre de l'acide lactique gauche, comme l'a constaté M. Frey. A raison de ce fait, on lui a donné le nom de *Bacterium ilei Frey;*

4° Un bâtonnet mobile, à la façon des bacilles du choléra, s'attaquant peu au dextrose, et mieux à la viande ; c'est le *B. liquefaciens ilei;*

5° Un bâtonnet court et en forme de coccus, le *Bact. ovale ilei*, donnant avec le sucre de l'alcool et de l'acide paralactique ;

6° Un bacille mobile se comportant vis-à-vis du sucre comme le précédent ;

7° Un bâtonnet court, vraisemblablement identique avec le *Bact. lactis aerogenes* d'Escherich, qui est anaérobie et fait fermenter le sucre avec dégagement d'acide carbonique et d'hydrogène.

Comme on le voit, et comme on pouvait s'y attendre, la plupart de ces microbes sont des ferments des matières hydrocarbonées, ceux qui résistent le mieux à l'acide du suc gastrique et sont les plus disposés à se développer quand le chyme a reçu la bile et le suc pancréatique. Nul doute qu'ils n'exercent une action puissante pendant la douzaine d'heures que les aliments passent en moyenne dans l'intestin grêle, où du reste on retrouve ceux de leurs produits qui n'ont pas été résorbés, tels que l'acide acétique, les acides lactiques, l'acide succinique, mélangés à de la dextrine, du sucre et, à des acides gras résultant d'un commencement de saponification.

Le *quantum* de cette action microbienne sur les substances hydrocarbonées est difficile à établir. D'une part en effet les microbes ne sont pas la seule cause active, et le suc gastrique, le suc pancréatique

donnent, comme on le sait, des diastases analogues aux leurs. De l'autre, il y a une absorption puissante qui élimine, à mesure de leur formation, les produits de transformation des substances hydrocarbonées.

MM. Macfadyen, Nencki et Sieber n'ont pas cherché à résoudre ce problème, mais ils ont cru pouvoir tenter de répondre à la question suivante : Quelle est la part exercée par les ferments des matières albuminoïdes dans le trajet au travers de l'estomac et de l'intestin grêle.

La réaction acide de la masse, son odeur faiblement putride et presque toujours faible semblaient bien indiquer qu'il n'y avait pas eu intervention active des ferments de la putréfaction, « mais il était possible qu'à défaut des produits définitifs de ce phénomène, l'indol, le scatol, le phénol, les acides gras, on y trouvât au moins les premiers produits de la transformation des matières albuminoïdes, les acides amidés et aromatiques trouvés dans la fermentation anaérobie de l'albumine ».

Une étude faite a montré qu'il n'y avait ni hydrogène sulfuré, ni mercaptan, ni leucine, ni tyrosine, ni d'autres acides que l'acide acétique et les acides lactiques qu'on peut supposer provenir de la fermentation des substances hydrocarbonées. On ne trouve guère que des peptones. De là, MM. Macfadyen, Nencki et Sieber concluent que « normalement, dans l'intestin grêle, les microbes n'ont aucune part, ou seulement une part très faible, à la décomposition de l'albumine ». L'affirmation me semble un peu excessive. Le premier effet de l'action des ferments des matières albuminoïdes est la peptonisation ; c'est même là le seul effet des diastases qu'ils sécrètent : c'est un fait que j'ai, je crois, annoncé le premier et qui a été confirmé par M. Harris et Tooth. Ce n'est qu'ensuite, et en empruntant aux peptones leur matière alimentaire, que les microbes la transforment en ces corps divers que MM. Macfadyen, Nencki et Sieber ont cherché sans les trouver. Si, comme cela est sur, l'absorption intestinale des peptones est rapide, celles-ci peuvent échapper aux microbes avant d'avoir subi une dislocation plus profonde, et on ne peut par suite conclure de l'absence de ces produits de dislocation à l'absence de toute action microbienne. Contentons-nous de dire que l'action de ces microbes, dans l'intestin grêle, est sans doute faible sur les matières albuminoïdes, plus forte sur les matières hydrocarbonées, sans que rien ne nous indique encore le *quantum* de l'action, qui doit être du reste variable suivant les estomacs, les jours et les régimes alimentaires.

Dx.

NENCKI, Sur la présence du méthylmercaptan dans l'urine humaine, après une consommation d'asperges, *Archiv. f. exp. Path. u. Pharmakol.*, t. XXVIII.

On sait que Nencki et N. Sieber ont trouvé le méthylmercaptan parmi les produits de la putréfaction de l'albumine, et l'ont rencontré souvent depuis dans leurs recherches sur les produits microbiens. Il existe par exemple dans les gaz du gros intestin de l'homme. M. Macfadyen l'a trouvé au nombre des produits volatils du fromage de Camembert lorsqu'il est mûr. Comme il a une odeur analogue à celle que présente l'urine après qu'on a mangé des asperges, M. Nencki a eu l'idée de le rechercher dans ce liquide. A sa prière, quatre des élèves de son laboratoire ont consommé à deux reprises 12 kilos d'asperges, avec accompagnement de beurre et de thé, et leurs urines, de 8 heures après les repas, ont été distillées au bain de sable, avec 10 grammes d'acide oxalique. D'après le procédé recommandé par Nencki et M. Sieber, les gaz passaient au travers d'un flacon laveur renfermant une solution à 3 0/0 de cyanure de mercure; sitôt l'urine entrée en ébullition, on vit ce liquide se troubler et donner un précipité vert jaunâtre. Pour en séparer le mercaptan méthyle, on lave bien ce précipité, on le traite pendant qu'il est encore humide par quelques gouttes d'acide chlorhydrique dans un petit tube à essai, on chauffe ensuite à l'ébullition, et on dirige les vapeurs dans une solution fraîchement préparée de sous-acétate de plomb à 3 0/0. Le méthylmercaptan, en arrivant au contact du sel de plomb, donne sur les parois du tube abducteur un précipité cristallin d'un jaune clair, et on perçoit en même temps l'odeur caractéristique du gaz. Il faut ne pas pousser trop loin l'opération pour éviter que l'acide chlorhydrique, en distillant à son tour, vienne dissoudre le précipité formé.

La quantité de matière recueillie avec l'urine était trop faible pour se prêter à une étude plus approfondie, mais les réactions qui précèdent suffisent pour qu'on puisse affirmer que le méthylmercaptan entre pour une part notable dans l'odeur spéciale que répand l'urine quand on a mangé des asperges. Le soufre de ce mercaptan vient sans doute de la matière albuminoïde, ou de l'asparagine, dans laquelle M. Loew en a découvert l'existence en faibles proportions.

DX.

D. PARIETTI, Méthode de recherche du bacille typhique dans les eaux potables, *Rivista d'Igiene*, t. I, n° 11.

En faisant des recherches sur le meilleur moyen de découvrir dans une eau le bacille typhique, M. Parietti a fait une remarque qu'on

avait faite avant lui pour d'autres microbes, mais qui, dans le cas du bacille typhique, suffirait à elle seule pour expliquer quelques-unes des contradictions relevées à propos de sa résistance aux solutions phéniquées ; c'est que la dose d'acide phénique capable d'arrêter le développement du bacille typhique dans une culture dépend, toutes choses égales d'ailleurs, de la quantité de semence introduite, de sorte qu'un même bouillon phéniqué restera limpide quand on y introduira seulement quelques germes, et se troublera quand ces germes seront plus nombreux.

Il est donc prudent, pour une recherche de cette nature, d'employer plusieurs bouillons inégalement phéniqués, et de les additionner de quantités variables d'eau suspecte. M. Parietti recommande la pratique suivante :

Il fait d'abord une solution acide de phénol, contenant 5 grammes d'acide phénique, 4 grammes d'acide chlorhydrique et 100 grammes d'eau distillée. Comme il est bien démontré maintenant que le bacille typhique supporte mieux qu'une foule d'autres microbes l'action de l'acide phénique et celle des milieux acides, cette solution acidulée de phénol convient très bien pour le mettre en évidence.

Dans des tubes à essai, contenant chacun 10^{cc} de bouillon de veau neutralisé, on ajoute 3, 6 et 9 gouttes de solution phéniquée ; chaque goutte équivaut environ à 1/30 de centimètre cube. On agite pour bien mélanger; on place pendant quelque temps ces tubes à l'étuve, de façon à pouvoir séparer ceux qui auraient été éventuellement contaminés pendant la manipulation, puis on les ensemence par série avec des quantités graduellement croissantes (1,2... 10 gouttes) de l'eau à examiner. Les eaux ordinaires, sans bacilles typhiques, ne troublent d'ordinaire, au bout de 48 heures, que les bouillons qui renferment le moins d'acide phénique et le plus d'eau ensemencée. Le bacille typhique, quand il existe, amène le plus souvent un trouble au bout de 24 heures. Pour le caractériser, on fait avec ces cultures des plaques de gélatine, des cultures sur pommes de terre, des préparations colorées, etc. Dans les réactions à faire entrer en ligne de compte, M. Parietti signale avec justice, l'étude de la réaction de l'indol. Kitasato [1] a montré que, contrairement a beaucoup d'autres bacilles qui pourraient être confondus avec lui, le bacille typhique ne donne pas cette réaction dans les cultures où il a poussé.

Dx.

1. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. VII, 1889.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte de rage pendant le traitement.

Fridy (Mohammed Djeguinine), 25 ans, soldat au 4e régiment de tirailleurs à Sfax (Tunisie). Mordu vers le 2 mai par un chien errant, qui a été abattu aussitôt. La main gauche porte 4 morsures, la main droite 5 morsures; ces blessures sont pénétrantes et ont saigné; un médecin les a cautérisées au fer rouge cinq heures après qu'elles ont été faites.

Fridy a été mis en traitement le 22 mai. Les premiers signes de la rage se sont manifestés le 5 juin par de la tristesse, de la céphalalgie, des douleurs dans le bras gauche, partant de la cicatrice des morsures. La rage est confirmée le 7 juin et Fridy succombe le 12 juin à la rage convulsive. (Observation de M. le professeur Kelsch, du Val-de-Grâce.)

Personne traitée morte de rage.

Frouin (Gaston), 16 ans 1/2, de Cubzac-les-Ponts (Gironde). Mordu par un chien, le 27 avril 1891, à la main droite, qui porte sur l'éminence hypothénar deux morsures profondes. Les blessures ont saigné et n'ont pas été cautérisées. Le chien mordeur a été reconnu enragé par M. Dureau, vétérinaire à Saint-André-de-Cubzac.

Frouin a été traité du 3 au 20 mai. Il est tombé malade le 28 mai et a succombé à la rage paralytique le 1er juin. (Observations du Dr Cherron.)

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — MAI 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	1	4	»	»	3	»	»	»
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	3		»	3		»	»	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	2	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	1	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	13	22	»	15	42	»	6	14
Morsures aux mains — multiples	»	9			27		»	8	
Cautérisations efficaces	1	»	»	4	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	12	»	»	17	»	»	4	»	»
Pas de cautérisation	9	»	»	21	»	»	9	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	4	10	»	5	20	»	4	14
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	6		»	15		»	10	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	9	»	»	9	»	»
Pas de cautérisation	9	»	»	9	»	»	4	»	»
Habits déchirés	7	»	»	18	»	»	12	»	»
Morsures à nu	3	»	»	2	»	»	2	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	1	1		1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	»	»	»	1	»	»
Habits déchirés	»	»	»	1	»	»	1	»	»
Morsures à nu	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Totaux. Français et Algériens		28	36		54	66		23	29
Totaux. Etrangers		8			12			6	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					131				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 124 fois; chats, 6 fois; cheval, 2 fois; âne, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et fils.

5me ANNÉE. JUILLET 1891. N° 7.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

LE CHIMIOTAXISME DES LEUCOCYTES ET L'INFECTION MICROBIENNE

Par J. MASSART ET CH. BORDET,
Étudiants en médecine à l'Université de Bruxelles.

A mesure que nos connaissances sur la vie des bactéries deviennent plus nettes et plus précises, l'infection microbienne nous apparaît comme un phénomène de plus en plus complexe. Tout au début de ces études, l'infection était considérée comme le résultat nécessaire de l'introduction de microbes pathogènes au sein de l'économie animale. Depuis lors, que de restrictions apportées à cette manière de voir! Un même microorganisme peut être pathogène pour certaines espèces et parfaitement inoffensif pour d'autres. Une même espèce animale présente des races qui résistent à un microbe donné et d'autres qui succombent inévitablement à l'inoculation. Certaines bactéries pathogènes peuvent être atténuées à tel point que leur introduction dans un animal, loin d'amener la mort de celui-ci, le rend au contraire capable de résister aux virus les plus forts. Une vaccination analogue peut être obtenue par la simple injection de produits microbiens stérilisés. On s'est occupé également des moyens qui sont mis en œuvre par l'animal inoculé pour résister à l'envahissement des microbes : la phagocytose et l'état bactéricide des humeurs jouent ici le rôle principal. Enfin, et c'est le point que nous traiterons dans cette notice, une espèce qui est réfractaire à un

microbe donné peut, sous l'influence de diverses causes, devenir apte à contracter la maladie. Cette modification constitue la prédisposition aux maladies infectieuses.

Parmi les causes qui affaiblissent ainsi l'immunité naturelle ou acquise sont : 1° l'introduction de produits sécrétés par l'espèce microbienne inoculée; 2° l'introduction de produits sécrétés par un autre microbe; 3° l'exposition de l'animal à des conditions défavorables à son existence, ou la production de lésions traumatiques; 4° l'introduction de certaines substances chimiquement définies ; 5° l'introduction d'anesthésiants.

1° *Introduction dans le corps de l'animal de produits sécrétés par le microbe inoculé.* — M. Roger (1) [1] constate que lorsqu'on injecte dans les veines d'un lapin le liquide exprimé des muscles œdématiés d'un animal mort du charbon symptomatique, ce lapin devient apte à contracter très facilement la maladie.

M. Bouchard (2) a réussi à conférer la maladie pyocyanique au lapin à l'aide de doses très faibles en lui injectant d'abord dans les veines une culture filtrée du *Bacillus pyocyaneus*. Nous avons répété ces expériences sur la souris. (V. plus loin, exp. XI.)

MM. Vaillard et Vincent (3) ont fait la même remarque pour les bacilles du tétanos ; ils admettent même que lorsque ceux-ci sont introduits seuls, les animaux ne succombent jamais.

M. Herman (4) obtient de la suppuration chez le lapin par de faibles quantités de *Staphylococcus pyogenes albus*, après avoir injecté l'extrait aqueux des cultures de ce microcoque.

Les observations de M. Courmont (5) et de MM. Rodet et Courmont (6) présentent avec les faits précédents une grande analogie. Le premier constate que l'injection des produits sécrétés par un microbe tuberculeux facilite, dans une très large mesure, l'infection ultérieure par ce même microbe. MM. Rodet et Courmont observent que l'action favorisante des produits du staphylocoque pyogène se maintient au moins trois mois.

Aux expériences où des substances sécrétées par des microbes sont injectées dans l'organisme animal, il convient de rattacher celles où ces corps se déversent lentement dans la circulation générale. Quand on inocule dans la chambre antérieure de l'œil

1. Les indications bibliographiques sont réunies à la fin du travail.

un microbe non pathogène pour l'animal en expérience, il arrive souvent que celui-ci succombe, tandis qu'il aurait parfaitement résisté à une inoculation faite ailleurs. Il en est ainsi, par exemple, pour le charbon symptomatique chez le lapin, d'après M. Roger (1), et pour le charbon bactéridien chez le pigeon, d'après M. Metchnikoff (7). Les microbes introduits dans la chambre antérieure se trouvent un certain temps à l'abri des phagocytes ; ils élaborent à leur aise des produits qui se répandent dans tout l'organisme.

2° *Introduction dans le corps de l'animal de produits sécrétés par un autre microbe* (*Association microbienne*). — Lorqu'on associe deux microbes différents, ou qu'après avoir injecté la culture stérilisée d'un microbe on inocule un second microbe vivant, plusieurs cas peuvent se présenter. Parfois on n'observe rien de particulier : c'est ce qui arrive, par exemple, quand on injecte à la souris une culture stérilisée ou vivante de *Bacillus fluorescens putidus*, et qu'on inocule ensuite le Bacille du pus bleu à faible dose. Dans d'autres cas, on constate que cette injection agit favorablement sur l'organisme et lui permet de résister au microbe pathogène; les nombreux essais de bactériothérapie en font foi. Enfin, et c'est ce qui nous intéresse surtout, l'introduction dans l'économie de microbes inoffensifs et même de leurs cultures stérilisées peut rendre l'animal apte à contracter des maladies infectieuses contre lesquelles il lutte avec avantage dans les conditions ordinaires.

M. Roger (8) produit la mort de lapins auxquels il injecte, en même temps que les bacilles du charbon symptomatique, des cultures vivantes de *Microbacillus prodigiosus* et même de ces cultures stérilisées. Il obtient le même résultat par l'injection de cultures de staphylocoques pyogènes et de *Proteus vulgaris* (9).

M. Monti (10) parvient à tuer des animaux par des cultures vieilles et atténuées de streptocoques pyogènes, de staphylocoques dorés et de pneumocoques, à la condition de faire une introduction simultanée d'une culture de *Proteus vulgaris*.

M. Bouchard (11) attribue dans beaucoup de cas la furonculose à la résorption des substances sécrétées par les microbes du tube digestif; l'antisepsie de ce canal arrête la maladie.

D'après MM. Vaillard et Vincent (3), l'injection de *Microbacillus prodigiosus* rend possible chez le lapin l'infection par le bacille de Nicolaïer.

Enfin, nos expériences (V. plus loin exp. XIV) nous ont montré que la souris blanche, qui est peu réceptive pour la maladie pyocyanique, contracte cette maladie quand on a introduit dans sa cavité péritonéale 1/40 de centimètre cube de culture stérilisée de *Microbacillus prodigiosus*.

3° *Exposition de l'animal à des conditions défavorables à son existence, ou production de lésions traumatiques.* — « Il suffit, disent MM. Nocard et Roux (12), de contondre fortement par un choc les muscles de la cuisse d'un cobaye, et d'injecter dans la masse musculaire meurtrie du virus atténué, qui resterait inoffensif s'il était introduit dans la cuisse saine, pour que l'animal succombe au charbon bactérien. »

M. Platania (13), après avoir introduit des pneumocoques de Friedländer dans la trachée du cobaye, produit une lésion aseptique de la plèvre et du poumon. Il constate que, dans ces conditions, l'infection est plus intense que chez les animaux dont ces organes sont intacts.

MM. Charrin et Roger (14) ont montré que des rats blancs que l'on surmène en les faisant marcher dans un tambour tournant, deviennent beaucoup plus aptes à contracter le charbon bactéridien et le charbon symptomatique.

La poule, qui est naturellement réfractaire au charbon, peut en être atteinte lorsqu'on la refroidit. Cette expérience, faite pour la première fois par M. Pasteur, a été répétée par M. Wagner (15).

M. Platania (13), après l'introduction de pneumocoques dans la trachée, place les animaux dans une atmosphère froide, et constate que plusieurs meurent de pneumonie.

D'après M. Charrin (16), le refroidissement diminue la résistance du cobaye à la maladie pyocyanique.

L'influence du jeûne a été étudiée par MM. Canalis et Morpurgo (17) : les pigeons affaiblis par l'inanition contractent très facilement le charbon.

La saignée agit également comme cause prédisposante : M. Serafini (18) injecte au chien, dans la trachée ou dans la

plèvre, des pneumocoques de Friedländer; ceux-ci ne se retrouvent dans le sang que lorsqu'on fait subir à l'animal une saignée copieuse.

M. Arloing (19) cite des expériences faites par M. Rodet avec le bacille du charbon; les moutons inoculés à l'oreille succombent plus facilement au charbon quand on pratique une saignée.

Il est enfin une altération qui, de même que la contusion, prédispose à des infections localisées : c'est la section des nerfs. Tous les traités d'ophtalmologie citent des cas de kératite survenant après une lésion du trijumeau. Mais les premières recherches expérimentales sur l'influence de la section nerveuse ont été instituées par MM. Charrin et Ruffer (20). Ils sectionnent chez le cobaye le nerf sciatique d'un côté et ils injectent dans les deux cuisses une même quantité de culture virulente du bacille pyocyanique. Une tuméfaction infectieuse apparaît des deux côtés; elle est plus forte dans le domaine du sciatique coupé. Chez le lapin, la section du sciatique ne paraît pas favoriser l'infection (16).

M. Roger (21) s'est occupé de la même question : il enlève d'un côté, chez le lapin, le ganglion cervical supérieur et il inocule, dans les deux oreilles, la même quantité de culture du streptocoque de Fehleisen. Pendant les trois premiers jours, l'oreille dont les vaisseaux sont paralysés est fortement œdématiée, et l'érysipèle y est plus accentué que dans l'oreille saine. Puis le tableau change : l'oreille énervée reprend son état normal, tandis que l'autre se couvre de pustules et peut même se sphacéler en partie.

Plus complètes et plus nettes sont les expériences de M. Herman (4). Il résèque une portion d'un des sciatiques à des lapins. Lorsque la cicatrisation de la peau est opérée, il leur injecte dans les veines des cultures de *Staphylococcus albus*. Il observe des arthrites, des abcès, des ostéomyélites qui se localisent presque exclusivement dans le membre soustrait à l'action nerveuse.

Enfin citons encore un fait observé par M. Féré (22) : il vaccine des hémiplégiques sur les deux bras; comme ils avaient été vaccinés peu d'années auparavant, l'éruption caractéristique ne se produit pas, mais des boutons de fausse vaccine se

développent avec une prédominance marquée du côté paralysé.

4° *Introduction dans le corps de l'animal de certaines substances chimiquement définies.* — D'après MM. Arloing, Cornevin et Thomas (23), l'acide lactique exalte la virulence du *Bacillus Chauvei*. MM. Nocard et Roux (12) ont démontré que l'acide agit, non pas sur le microbe pour augmenter son activité, mais bien sur les tissus pour diminuer leur résistance. L'acide acétique, le lactate de potassium, le chlorure de potassium, l'alcool étendu produisent le même effet : pour amener la mort de l'animal, il faut injecter dans le même muscle la substance nuisible et le virus. M. Roger (9) a obtenu le même résultat par l'injection de triméthylamine.

MM. Vaillard et Vincent (3) donnent le tétanos au lapin en injectant de l'acide lactique au point d'inoculation du bacille tétanique.

Chacun sait que, dans les affections débilitantes comme le diabète, l'organisme est très apte à présenter de la suppuration. Les expériences de M. Bujwid et de M. Leo rendent compte de cette prédisposition.

M. Bujwid (24) montre que l'injection intra-veineuse de glycose détermine de la suppuration au point où l'on inocule le *Staphylococcus pyogenes*. Donc accumulation de leucocytes.

M. Leo (25) donne à des rats et à des souris un diabète expérimental par l'ingestion de phloridzine ; il fait perdre ainsi aux rats leur immunité contre le charbon, et aux souris leur résistance à la morve.

Divers auteurs ont répété ces expériences avec un résultat différent. M. Herman (4) injecte dans le tissu cellulaire du lapin 1 centimètre cube d'acide phénique à 3 0/0 ; une heure après, il inocule au même point une dose de staphylocoques trop faible pour causer de la suppuration dans les conditions normales, et il obtient un abcès. Le sublimé à 1 0/0 donne un résultat beaucoup moins marqué.

5° *Introduction dans le corps de l'animal de substances anesthésiantes.* — M. Platania (26) a pu conférer le charbon à des chiens, à des grenouilles et à des pigeons en les soumettant à l'action du curare, de l'alcool et du chloral.

M. Wagner (15) a également rendu des poules charbonneuses par l'emploi du chloral.

Les nombreux faits que nous venons de citer permettent la conclusion suivante : l'injection de produits microbiens et de certaines substances chimiquement définies, l'exposition de l'animal à des conditions anormales d'existence, ainsi que son anesthésie, diminuent la résistance de l'économie à l'envahissement par les microbes.

Nous avons maintenant à rechercher par quels procédés les divers facteurs dont nous avons parlé agissent sur le mécanisme de l'infection. Pour expliquer ces influences, deux théories ont été successivement émises par M. Bouchard. Avant de les aborder, il nous faut exposer nos connaissances actuelles sur le chimiotaxisme des leucocytes, car il nous paraît démontré, ainsi qu'à M. Bouchard (2), que ce mode d'irritabilité des globules blancs joue un rôle prépondérant dans l'affaiblissement de l'immunité.

Depuis plusieurs années déjà, on avait observé que certaines substances contenues dans des cultures de bactéries produisent une collection purulente aux points où elles sont injectées. M. Grawitz (27) admet que certains produits du staphylocoque doré interviennent dans la suppuration. Il démontre ensuite (28) que la cadavérine produit un abcès quand elle est injectée dans le tissu cellulaire du chien.

M. Scheuerlen (29) montra également que des solutions de cadavérine et de putrescine, des cultures stérilisées de staphylocoques, une macération putréfiée puis stérilisée de chair de lapin, peuvent occasionner de la suppuration sans microbes.

Pour ce qui concerne les produits des staphylocoques, le fait a été vérifié par M. Christmas-Dirckinck-Holmfeld (30), par M. Karlinski (31) et par M. Steinhaus (32). Ce dernier obtient également des collections purulentes chez les chiens par l'injection de *M. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* et *B. anthracis*.

M. Leber (33) a isolé des cultures de staphylocoques pyogènes une substance cristallisée qu'il appelle *phlogosine*, et qui possède la propriété d'attirer les leucocytes. Il fait remarquer l'analogie de cette attraction avec celle que M. Pfeffer a constatée

sur les spermatozoïdes des cryptogames, en présence de certaines substances chimiques.

M. Pekelharing (34) introduit sous la peau de la grenouille du fulmicoton imprégné de culture du *B. anthracis*. Après quelques heures, un grand nombre de leucocytes se sont insinués entre les brins de coton. Cette expérience est la première qui fut instituée pour démontrer d'une façon directe l'attraction que certains produits bactériens exercent sur les leucocytes.

L'irritabilité de ces cellules a été étudiée par nous l'année dernière au laboratoire de physiologie de l'Institut Solvay (35). Nous déposons des tubes capillaires de verre remplis de cultures vivantes ou stérilisées de bactéries dans la cavité péritonéale de grenouilles; le lendemain, ces tubes sont bourrés de leucocytes. Cette migration cellulaire est enrayée lorsque la grenouille est anesthésiée.

M. Gabritchewsky (36) fit un grand nombre d'expériences du même genre sur la grenouille et sur le lapin.

Une conclusion commune aux expériences de M. Gabritchewsky et aux nôtres, c'est que la substance qui attire les leucocytes est dissoute dans le milieu de culture.

M. Buchner a repris la question. Son dispositif expérimental consiste aussi dans l'introduction au sein des tissus de tubes contenant le liquide à essayer. Mais, au lieu de se servir du milieu de culture, M. Buchner remplit les tubes d'une solution de protéine obtenue en traitant les microbes eux-mêmes. Il a pu contater ainsi que les protéines extraites des diverses bactéries, et en particulier du pneumocoque de Friedländer (37) et du bacille pyocyanique (38), agissent comme des excitants énergiques des leucocytes. Il tend à admettre que le liquide de culture lui-même ne possède pas le pouvoir d'attirer les globules blancs. Nous ne pouvons pas nous rallier à cette opinion en présence des expériences faites par M. Gabritchewsky (36) sur les liquides de culture filtrés du bacille pyocyanique, expériences que nous pouvons confirmer.

Ces diverses recherches montrent que certains produits bactériens ont le pouvoir d'attirer les leucocytes; ces derniers sont ainsi amenés au contact des microbes qui tendent à envahir l'économie; ils peuvent les détruire sur place avant que les bactéries n'aient eu le temps de sécréter de grandes quantités de poisons.

Les études de M. Metchnikoff rendent de plus en plus probable que l'immunité repose en grande partie sur la phagocytose. Pour que celle-ci puisse s'accomplir efficacement, il faut que les globules blancs, qui comptent parmi les phagocytes les plus actifs, s'amassent aux points menacés de l'économie. Or, il résulte des expériences de M. Bouchard, ainsi que de celles que nous exposerons ultérieurement, que chez les animaux dont l'immunité est affaiblie par l'une des causes prédisposantes, les leucocytes ont perdu la faculté de se porter au-devant des ennemis.

M. Bouchard (2) insère sous la peau du lapin une cellule de Hess avec une culture de *Bacillus pyocyaneus*. Au bout de quelques heures, la cellule renferme un grand nombre de leucocytes. Il n'en est plus de même lorsque, après l'introduction de la cellule de Hess, on injecte dans les veines de l'animal 10cc de culture pyocyanique stérilisée ; la cellule contient alors très peu de globules blancs. Des expériences analogues ont été faites avec plusieurs autres microbes chez le lapin, le cobaye et le chien. Le résultat est toujours le même.

Dans un autre travail (39), M. Bouchard cite l'expérience suivante : il introduit des cellules de Hess, remplies d'une culture du bacille du pus bleu, sous la peau de lapins dont les uns sont laissés en liberté, tandis que les autres sont immobilisés en vue de produire la réfrigération. Chez les premiers, les cellules renferment, après un séjour de quelques heures, d'abondants leucocytes ; chez les seconds, l'effet est bien moins marqué.

Ces recherches, ainsi que d'autres dont nous parlerons plus loin, montrent clairement que les causes prédisposantes que nous avons citées s'opposent à l'accumulation des leucocytes aux endroits menacés d'infection : leur chimiotaxisme est mis en défaut. Quelle est la raison de ce manque d'activité ? C'est ce que nous allons maintenant étudier.

M. Bouchard conclut de ses premières expériences (2) que les produits microbiens exercent sur les leucocytes une action stupéfiante : lorsqu'on introduit dans la circulation une culture stérilisée de bactéries, les globules blancs sont paralysés et ne peuvent plus aller s'amasser dans le voisinage des bactéries virulentes ; c'est de cette façon que s'expliquerait l'absence de leucocytes dans les cellules de Hess remplies de culture

pyocyanique, lorsqu'on injecte dans les veines 10cc du liquide de culture stérilisé de ce microbe.

Cette théorie est passible de nombreuses objections, reposant sur des faits expérimentaux que nous allons rapidement exposer.

Nos recherches ont été faites à l'aide de *M. prodigiosus*. Les expériences de M. *Roger* (8 et 9) ont montré que l'injection de cultures de ce microbe rend le lapin réceptif pour le charbon symptomatique. Celles de MM. *Vaillard et Vincent* (3) démontrent le même fait pour le tétanos. Les deux expériences suivantes permettent de conclure que l'injection de cultures de *M. prodigiosus* facilite chez le lapin l'éclosion de la maladie pyocyanique.

Exp. I. — 18 juillet 1890. A 9 h. 20 du matin, un lapin reçoit sous la peau 1cc de culture active de *M. prodigiosus*.

A 10 h. 10, il reçoit en injection sous-cutanée 0cc,5 de culture active de *Bacille pyocyanique*. (On sait que cette dose est insuffisante pour conférer la maladie pyocyanique au lapin normal.)

Le 22 juillet, le lapin paraît abattu.

Le 25 juillet, il est dans un état de prostration marquée; il a maigri, n'a pas d'appétit. La patte postérieure droite est paralysée.

Le 29 juillet, il est mort. A l'autopsie, on trouve une entérite très accentuée; l'intestin est fortement congestionné. Sous la capsule du rein droit, il y a de la suffusion sanguine; on trouve de l'hémorragie en deux endroits de la substance corticale du même rein.

L'expérience II montre que cette réceptivité, plus grande pour la maladie pyocyanique, s'observe même chez le lapin vacciné.

Exp. II. — 16 juillet 1890. Deux lapins, A et B, reçoivent tous les 4 jours de 0cc,6 à 0cc,7 de culture pyocyanique; cette injection est répétée 5 fois.

Le 6 août les deux lapins reçoivent une 6e injection de 0cc,6, et l'un des deux (A) reçoit en outre 1cc de culture de *M. prodigiosus*.

Le 7 août le lapin B est normal.

Le lapin A est mort. A l'autopsie, on ne trouve pas d'entérite; il y a des suffusions sanguines sous la capsule du rein et une congestion très marquée à la base des pyramides.

Il ressort clairement de ces expériences que le *M. prodigiosus*, répandu dans l'économie, diminue la résistance de celle-ci contre le *B. pyocyaneus*. Par quel procédé? Comme l'admet M. Bouchard pour d'autres microbes, c'est en empêchant les leucocytes d'aller

détruire les bactéries pathogènes aux points d'inoculation. En voici la preuve.

Exp. III. — 29 mai 1890. A 7 h. 10 du matin, on injecte sous la peau d'un lapin 1cc de culture active de *M. prodigiosus*.

A 7 h. 20, des tubes capillaires contenant une culture active de *B. pyocyaneus* sont introduits dans la cavité péritonéale.

A 3 h. 20 du soir, les tubes sont retirés; ils ne contiennent pas du tout de leucocytes.

Les produits sécrétés par le *M. prodigiosus* entravent donc les mouvements chimiotaxiques des leucocytes, et ceux-ci ne sont plus attirés par les bacilles pyocyaniques.

L'expérience suivante indique qu'il en est de même pour le *Bacillus Chauvæi*.

Exp. IV. — 14 juillet 1890. A 10 heures du matin, 1cc de culture active de *M. prodigiosus* est injecté sous la peau d'un lapin.

A 11 h. 10, on introduit dans la cavité péritonéale des tubes capillaires renfermant la sérosité musculaire d'un animal mort du charbon symptomatique. (Des expériences antérieures nous avaient démontré que cette sérosité attire abondamment les leucocytes des lapins normaux.)

A 6 heures du soir, on retire les tubes capillaires; ils ne contiennent pas du tout de leucocytes.

Ces expériences sont conformes à celles de M. Bouchard et elles nous conduisent au même résultat. Maintenant, nous nous posons cette question : les leucocytes de nos lapins ont-ils été « stupéfiés » par les produits du *M. prodigiosus?*

L'expérience V permet d'y répondre négativement.

Exp. V. — 28 juillet 1890. A 10 heures du matin, nous plaçons dans le tissu cellulaire sous-cutané d'un lapin une bourre de fulmicoton imprégnée d'une culture active de *M. prodigiosus* [1].

1. Pour toutes nos expériences, nos cultures de microbes étaient faites dans un même milieu, dont voici la composition :

Eau	1000 gr.
Peptone	20
Glycose	10
Phosphate bipotassique	1
Sulfate de magnésie	0.5
Chlorure de calcium	0.5
Chlorure de sodium	5
Bicarbonate de sodium q. s. jusqu'à faible réaction alcaline.	

Ce liquide présente pour nos recherches un grand avantage : quand la peptone et la glycose ont été assimilées par les microbes, il a sensiblement la même concentration que le sérum sanguin, et les globules blancs ne s'y altèrent point.

A 3 heures du soir, le fulmicoton est retiré et examiné sur la platine chauffante réglée à 38°. Les leucocytes présentent des mouvements amiboïdes; beaucoup d'entre eux rampent sur les brins de coton et contre la surface du verre-couvreur.

La conclusion s'impose : baignés dans la culture de *M. prodigiosus*, les leucocytes n'ont été ni stupéfiés ni paralysés ; *ils ont conservé intactes leur irritabilité et leur mobilité.*

Et d'ailleurs toutes les études de chimiotaxisme faites antérieurement par divers auteurs montrent qu'il devait en être ainsi : lorsqu'on place des tubes capillaires remplis d'une culture de microbe dans les tissus d'un animal *normal*, les produits microbiens diffusent lentement vers l'extérieur ; les leucocytes qui se trouvent dans le champ de diffusion, loin d'être stupéfiés, loin d'être paralysés, se rapprochent de l'orifice du tube. s'y introduisent et continuent à s'y mouvoir.

M. Metchnikoff (40) était arrivé à la même conclusion : dans les cas où l'inoculation du *B. anthracis* provoque la mort de l'animal, il constate que la destruction des microbes par les phagocytes n'a pas lieu et il ajoute : « Il est facile de constater que cette inaptitude ne résulte nullement de la paralysie des leucocytes, puisque ceux-ci se meuvent en même temps à leur façon ordinaire, et englobent aussi des petits corps étrangers, ainsi que les microbes autres que les bactéridies. »

Nous croyons donc pouvoir écarter la première hypothèse de M. Bouchard. L'auteur tend du reste à ne plus lui accorder qu'une importance secondaire : dans son *Essai d'une théorie de l'infection*, il insiste surtout sur une seconde hypothèse, fondée sur des études de MM. Charrin et Gamaleia (41) et de MM. Charrin et Gley (42).

Ces auteurs admettent que la présence de produits microbiens paralyse le centre vaso-dilatateur. A l'appui de cette opinion, ils invoquent des expériences dans lesquelles ils ont, à diverses reprises, excité par des courants interrompus le nerf dépresseur chez le lapin.

Il ne nous paraît pas démontré que deux excitations successives du même nerf doivent nécessairement provoquer des effets identiques, surtout lorsqu'il s'agit de courants induits,

difficiles à doser et agissant sur un nerf aussi ténu que le nerf dépresseur du lapin; le procédé expérimental nous semble sujet à caution. Les auteurs n'ont pas démontré que la dessiccation du nerf ou le fait même d'avoir subi « à plusieurs reprises et à des intervalles de temps convenables l'action des courants induits » n'intervient pas comme facteur principal dans les résultats qu'ils mentionnent. Pour accepter leur opinion, nous devrions admettre que des excitations successives et supposées identiques donnent toujours des réflexes de dépression égaux entre eux : c'est là un point qui reste à démontrer, bien que MM. Charrin et Gley le supposent acquis.

Quant à MM. Charrin et Gamaleia, ils renvoient, pour l'interprétation des phénomènes qu'ils observent, au travail de MM. Charrin et Gley.

M. Bouchard considère ces expériences comme concluantes et voici en quels termes il s'exprime :

« Je puis donc dire maintenant que les microbes pathogènes, ou ceux d'entre eux sur lesquels a porté mon étude, sécrètent une substance qui paralyse le centre vaso-dilatateur, et que, même s'ils fabriquent des substances capables de produire une irritation locale, la paralysie vaso-dilatatrice qu'ils provoquent empêche les phénomènes inflammatoires de se produire dans la partie lésée, et spécialement la dilatation vasculaire, l'exsudation et la diapédèse. De cette façon, les microbes sont soustraits à l'une des causes de destruction, le phagocytisme, et peuvent se développer, pulluler et sécréter en liberté. »

Nos résultats ne concordent pas avec cette théorie. En raison des objections que nous avons fait valoir plus haut contre le procédé adopté par MM. Charrin et Gley, nous avons fait nos expériences en tâchant d'éviter les causes d'erreur.

Nos recherches ont porté sur des lapins blancs et des souris blanches. Nous leur conférons la maladie pyocyanique par l'inoculation sous-cutanée d'une très petite quantité de bacilles du pus bleu et l'injection intra-péritonéale ou sous-cutanée de culture stérilisée du même bacille ou du *M. prodigiosus*. Immédiatement après cette opération, nous cautérisons légèrement le milieu d'une des oreilles; il est facile de constater si cette brûlure provoque de la dilatation vasculaire.

Exp. VI. — 30 avril 1891. A 1 h. 50 du soir, deux lapins, A et B, reçoivent dans le tissu cellulaire sous-cutané 20cc de culture filtrée de *B. pyocyaneus*. Immédiatement après, l'une des oreilles est brûlée en son milieu. A 2 heures, le lapin A reçoit 1/4cc de culture virulente de *B. pyocyaneus*.

A 2 h. 5 du soir, les deux lapins présentent une auréole rouge tout autour de la brûlure; la dilatation vasculaire s'est produite aussitôt après la cautérisation.

1er mai. A 9 h. 30 du matin, la dilatation vasculaire persiste chez les deux lapins. Le lapin A a de la diarrhée. Le lapin B paraît normal.

2 mai. A midi, la rougeur de l'oreille persiste chez le lapin B. Le lapin A est mort. A l'autopsie on trouve l'intestin et les reins atteints d'hémorragies; des cultures faites avec le suc du foie, de la rate et des reins démontrent la présence du *B. pyocyaneus*.

La conclusion de cette expérience est que l'injection de culture pyocyanique, en quantité suffisante pour détruire l'immunité du lapin contre la maladie pyocyanique, n'empêche nullement la dilatation vasculaire.

Les expériences suivantes, faites sur la souris, conduisent à la même conclusion.

Exp. VII. — 5 mars 1891. A 10 heures du matin, nous injectons à une souris blanche 0cc,1 de culture stérilisée de *B. pyocyaneus*, dans la cavité péritonéale, puis nous inoculons sous la peau, à l'aide d'une aiguille de platine, une culture sur gélose du même bacille[1]. Aussitôt après, nous cautérisons une oreille. L'oreille rougit immédiatement. A 8 heures du soir, l'oreille cautérisée est très congestionnée.

Le 6 mars 1891, à 11 heures du matin, la souris est morte.

Exp. VIII. — 5 mars 1891. A 10 h. 20 du matin, on injecte à une souris blanche, dans la cavité péritonéale, 0cc,05 de culture pyocyanique stérilisée, puis on fait, comme dans l'expérience VII, l'inoculation sous-cutanée de culture pyocyanique sur gélose et la cautérisation de l'oreille droite. Celle-ci rougit immédiatement.

A 8 heures du soir, l'oreille droite est congestionnée.

6 avril, 11 heures du matin. La souris est très malade. L'oreille droite est toujours rouge.

A 2 heures du soir, la souris meurt.

Exp. IX. — Le 5 mars 1891. A 10 h. 40 du matin, nous injectons, dans la cavité péritonéale d'une souris blanche, 0cc,05 de culture stérilisée

1. Des expériences antérieures nous avaient montré que la souris ne succombe jamais à l'inoculation sous-cutanée de cette minime quantité de *B. pyocyaneus* vivant.

de *B. pyocyaneus*, puis nous cautérisons l'oreille droite, qui rougit aussitôt.

A 8 heures du soir, l'oreille droite est congestionnée.

Le lendemain, à 11 heures du matin, la souris est morte.

Les expériences VII, VIII et IX montrent que la congestion vasculaire n'est nullement entravée par l'injection de culture pyocyanique en quantités telles qu'elles empoisonnent d'emblée l'organisme.

Dans les expériences X et XI, nous diminuons la dose.

Exp. X. — 10 mars. A 10 h. 30 du matin, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,025 de culture pyocyanique stérilisée, puis nous cautérisons l'oreille droite. Celle-ci rougit immédiatement.

11 mars. L'animal paraît malade. L'oreille est toujours rouge.

12 mars. L'oreille est rouge. L'animal paraît rétabli.

15 mars. L'animal est entièrement guéri ; l'oreille est encore congestionnée.

Exp. XI. — 10 mars 1891. A 11 heures du matin, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,025 de culture pyocyanique stérilisée, puis nous inoculons sous la peau, à l'aide de l'aiguille de platine, le bacille pyocyanique cultivé sur gélose. Enfin nous cautérisons l'oreille droite. Celle-ci se congestionne aussitôt.

11 mars. L'oreille droite est plus rouge. La souris est très malade.

12 mars. La souris est morte.

Une dose de culture stérilisée de *B. pyocyaneus* suffisante pour rendre la souris malade, mais non pour la tuer, n'empêche donc pas la dilatation vasculaire.

Dans les quatre expériences suivantes, nous injectons non pas la culture pyocyanique stérilisée, mais la culture stérilisée du *M. prodigiosus*.

Exp. XII. — 13 mars 1891. A 9 heures du matin, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,05 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*, puis nous inoculons sous la peau une culture de *B. pyocyaneus* sur gélose au moyen de l'aiguille de platine. Enfin nous cautérisons l'oreille droite. Celle-ci devient aussitôt rouge.

14 mars. La souris est très malade. L'oreille droite est fortement injectée.

15 mars. L'animal est mort.

Exp. XIII. — 13 mars 1891. A 9 h. 30 du matin, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,05 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*, puis nous cautérisons l'oreille droite, qui rougit immédiatement.

14 mars. La souris est morte.

Les expériences XII et XIII font voir qu'une quantité de culture stérilisée de *M. prodigiosus*, suffisante pour intoxiquer une souris, n'entrave pas la dilatation vasculaire. Il en est de même pour une dose plus faible, ainsi que l'indiquent les expériences XIV et XV.

Exp. XIV. — 18 mars 1891. A 2 h. 30 du soir, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,025 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*. Nous inoculons sous la peau le *B. pyocyaneus* sur gélose, et nous cautérisons l'oreille droite qui rougit immédiatement.

A 9 h. 30 du soir, l'oreille est rouge. La souris est malade.

19 mars, 10 heures du matin. La souris est morte.

Exp. XV. — Le 29 mars 1891, à 3 heures du soir, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris 0cc,025 de culture stérilisée de *M. prodigiosus;* nous cautérisons l'oreille droite, qui rougit.

Le lendemain, l'oreille est encore congestionnée. La souris est bien portante. Elle reste normale.

Les expériences VI à XV nous permettent de tirer les conclusions suivantes : 1° l'introduction dans la circulation de cultures stérilisées de *B. pyocyaneus* et de *M. prodigiosus* en quantités suffisantes pour rendre le lapin et la souris aptes à contracter la maladie pyocyanique n'empêche en aucune façon la dilatation vasculaire.

2° L'introduction de doses trop fortes, capables de produire la mort de la souris par intoxication directe, est également incapable d'entraver la dilatation vasculaire.

Nous ne pouvons donc accepter la seconde hypothèse formulée par M. Bouchard. D'ailleurs nous nous permettrons de faire remarquer que même *a priori* son interprétation laisse beaucoup à désirer. N'observe-t-on pas, en effet, que l'inoculation de microbes ou de produits microbiens en un point déterminé des tissus, y détermine soit un œdème inflammatoire, soit une gomme, soit un abcès, toutes lésions qui s'accompagnent d'une dilatation visible des vaisseaux?

Et quand bien même il serait démontré que, comme le veulent MM. Charrin et Gley, les centres vaso-dilatateurs dépendant du nerf dépresseur sont paralysés par l'injection de certains produits de culture, en quoi cette paralysie empêcherait-elle la dilatation vasculaire limitée qui intervient dans l'infection locale au siège

de l'inoculation? N'existe-t-il pas dans les centres vaso-dilatateurs une autonomie telle que les actions locales gardent toujours un certain pouvoir, comme on le constate même après la destruction des centres vaso-moteurs bulbaires? Tout le monde sait qu'après la section de la moelle cervicale, si grande que soit la dilatation vasculaire générale obtenue, il existe encore un certain tonus entretenu par les ganglions, de manière qu'une irritation locale ou une section de filaments nerveux pourra encore provoquer une dilatation plus considérable dans un territoire déterminé.

Il faudrait donc supposer, pour admettre la manière de voir de MM. Bouchard, Charrin et Gley, que l'injection de certains produits de culture paralyse partout les centres vaso-dilatateurs : ce n'est qu'à cette condition que leurs conclusions seront autorisées. Mais s'il y avait paralysie de tous les centres vaso-dilatateurs, il devrait se produire aussitôt une élévation inaccoutumée de la pression aortique[1]? Nous ne trouvons rien de semblable dans les tracés de MM. Charrin et Gley. D'autre part, les expériences VI à XV que nous venons de rapporter, montrent que l'injection de produits bactériens, loin de donner lieu à une constriction générale des artérioles, n'est pas le moins du monde un obstacle à leur dilatation.

La question nous semble donc jugée.

Nous avons maintenant à exposer comment, à notre avis, les causes prédisposantes influencent l'infection. Nous ne pensons pas que ce mécanisme soit unique. Nous avons étudié chez le lapin le mode d'action de quatre causes prédisposantes : l'injection de produits microbiens, le vernissage, l'anesthésie et la présence d'acide lactique.

Pour ce qui concerne l'injection de produits microbiens, les expériences de M. Bouchard (2) et les nôtres mettent hors de doute que les microbes virulents n'attirent plus, dans ce cas, les globules blancs. Nous croyons avoir démontré que cette absence de phagocytes aux points menacés n'est due ni à la paralysie

1. Le tonus vasculaire est l'expression d'un équilibre instable entre les actions antagonistes des vaso-dilatateurs et des vaso-constricteurs. Annihiler les vaso-dilatateurs, c'est rompre l'équilibre, et par conséquent c'est permettre une constriction vasculaire dont le premier effet doit être l'élévation de la pression aortique.

de ces cellules, ni au défaut de dilatation vasculaire. Les expériences suivantes permettent de pénétrer le pourquoi de l'inactivité des leucocytes.

Exp. XVI. — 18 juillet 1890. A 9 h. 25 du matin, un lapin reçoit sous la peau 1cc de culture de *M. prodigiosus*. A 10 heures, le lapin est saigné. Le sang est mis dans une éprouvette sur la machine à force centrifuge. A midi, le sérum parfaitement limpide et séparé du caillot est recueilli et introduit dans des tubes capillaires. Des tubes sont introduits dans la cavité abdominale d'un second lapin.

A 8 heures du soir, les tubes sont retirés; ils renferment beaucoup de leucocytes. Ceux-ci sont mobiles; ils sont accolés aux parois du tube et forment de petits amas séparés.

Exp. XVII. — 11 avril 1891. A 9 h. 30 du matin, un lapin est couché sur le chevalet. On ouvre la carotide gauche et on prélève une quinzaine de centimètres cubes de sang (A). De 9 h. 35 à 9 h. 50, on lui injecte en doses fractionnées 20 centimètres cubes de culture stérilisée de *B. pyocyaneus*, sous la peau du ventre et des cuisses. A 10 h. 10, on lui prélève de nouveau une quinzaine de centimètres cubes de sang (B). Les deux éprouvettes, contenant le sang A et le sang B, sont placées dans une glacière.

13 avril. A 8 heures du matin, les deux éprouvettes sont retirées de la glacière. Le sérum limpide qui surnage est introduit dans des tubes capillaires. Ceux-ci sont placés dans la cavité abdominale d'un second lapin.

A 4 heures, les tubes sont retirés. Le sang A, prélevé au lapin normal, n'a pas attiré de leucocytes. Le sang B, soustrait au lapin après injection de 20cc de culture pyocyanique stérilisée, a au contraire exercé une très forte attraction. Les globules blancs sont mobiles et forment de petits amas séparés à l'intérieur des tubes.

Quelle est la conclusion logique de ces expériences? Le sérum sanguin du lapin normal n'exerce sur les leucocytes aucune attraction. Au contraire, le sérum de l'animal auquel on a injecté 1cc de culture de *M. prodigiosus*, ou 20cc de culture pyocyanique stérilisée, attire fortement les globules blancs.

Qu'arrive-t-il lorsqu'à un lapin dont le sang contient des produits microbiens en quantité suffisante on inocule des microbes virulents? Les leucocytes, attirés de toutes parts par les humeurs de l'animal, ne manifestent plus de mouvements chimiotaxiques.

Cette conclusion est entièrement d'accord avec les faits observés par M. Pfeffer (43) : les spermatozoïdes des fougères sont attirés par une solution d'acide malique; mais lorsque le

liquide dans lequel ils nagent contient lui-même de l'acide malique, on constate que pour qu'ils soient attirés par une solution du même corps, il faut que cette dernière solution soit 30 fois plus concentrée que le liquide qui les baigne : lorsque les spermatozoïdes se trouvent dans une solution à 1 pour 1,000, ils ne sont attirés dans des tubes capillaires que si la solution d'acide malique y est à 30 pour 1,000. Pour les spermatozoïdes des mousses, qui sont sensibles à la saccharose, il faut que le rapport soit de 50 à 1.

Il est probable que dans le chimiotaxisme des leucocytes interviennent des conditions analogues. Contrairement à ce qui se passe chez les animaux normaux, dont les humeurs sont dépourvues de substances attirantes, les leucocytes plongés dans un liquide qui renferme une certaine dose de produits bactériens n'ont aucune tendance à se diriger vers les tubes capillaires ou vers les microbes introduits ; la différence entre les valeurs attractives du liquide qui les baigne et du liquide qui diffuse des tubes ou des microbes n'est pas assez forte. Les phagocytes ne se porteront donc pas au-devant des envahisseurs, et ceux-ci pourront se développer sur place et sécréter des quantités considérables de poison. C'est ce qui arrive quand on injecte à l'animal des produits sécrétés par le microbe inoculé ou par un autre microbe, ou bien lorsqu'on fait l'inoculation dans la chambre antérieure de l'œil. Dans ce dernier cas, les microbes ont tout le temps de déverser leurs produits avant de devenir la proie des leucocytes.

Si, dans les conditions que nous venons d'examiner, la diminution de résistance aux maladies infectieuses est bien due à ce que les phagocytes sont retenus dans les tissus par les substances microbiennes injectées, il faut qu'elle disparaisse à mesure que les produits attirants sont éliminés. Les expériences suivantes montrent qu'il en est ainsi.

Exp. XVIII. — 18 mars 1891. A 2 h. 30 du soir, nous injectons dans la cavité péritonéale d'une souris blanche 0cc,025 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*.

Le 21 mars, à 9 heures du matin, nous inoculons sous la peau, à l'aide de l'aiguille de platine, une culture de *B. pyocyaneus* sur gélose.

Le 22 mars, la souris est bien portante.

Le 6 avril, la souris est restée en parfaite santé.

Lorsque l'inoculation sous-cutanée de *B. pyocyaneus* est faite 3 jours après l'injection de culture stérilisée de *M. prodigiosus*, l'infection ne se produit pas.

Exp. XIX. — Le 20 mars 1891, à 12 heures, nous injectons dans la cavité abdominale d'une souris blanche 0cc,025 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*.

Le 21 mars, à 8 h. 45 du matin, nous inoculons sous la peau, à l'aide de l'aiguille de platine, des bacilles pyocyaniques cultivés sur gélose.

Le 22 mars, la souris est bien portante.

Le 6 avril, elle est restée normale.

Il suffit donc de moins d'un jour entre l'injection de la culture stérilisée de *M. prodigiosus* et l'inoculation du *B. pyocyaneus* pour que celui-ci ne se développe pas.

Exp. XX. — Le 24 mars 1891, à 9 heures du matin, nous injectons dans la cavité abdominale d'une souris blanche 0cc,025 de culture stérilisée de *M. prodigiosus*.

Le même jour, à 4 heures du soir, nous faisons une inoculation sous-cutanée de *B. pyocyaneus* cultivés sur gélose.

Le 22 mars, la souris est bien portante.

Le 6 avril, elle est toujours normale.

Un intervalle de 7 heures entre les deux opérations est donc suffisant pour que l'inoculation de bacilles pyocyaniques n'ait pas de suites fâcheuses.

Si nous rapprochons ces trois dernières expériences de l'expérience XIV, nous constatons qu'en moins de 7 heures l'élimination des produits microbiens injectés est suffisante pour que l'augmentation de réceptivité de la souris ait disparu.

Nous ne prétendons pas expliquer par la rétention des phagocytes au sein des tissus la diminution de la résistance dans tous les cas où des produits microbiens sont introduits dans la circulation d'un animal. Ainsi dans les expériences de M. Courmont et de MM. Rodet et Courmont, où la réceptivité se conserve pendant très longtemps, elle tient probablement à d'autres causes. Quant à la bactériothérapie, elle s'explique par l'antagonisme des bactéries.

Peut-on appliquer à la diminution de résistance de l'organisme par des causes telles que la réfrigération, le jeûne, le diabète, la fatigue, la section des nerfs, etc., l'interprétation que nous proposons pour la réceptivité due à l'injection de produits microbiens? Dans la majorité des cas, nous croyons à l'importance du facteur que nous signalons.

M. Bouchard (39) a constaté que, chez le lapin refroidi, des cellules de Hess remplies de culture pyocyanique. attirent à peine les leucocytes. Il est possible que dans ce cas l'inactivité des phagocytes soit due partiellement à leur paralysie par le froid, mais il nous paraît probable qu'à cette influence il faut en ajouter une autre. Les animaux soumis à des conditions nuisibles d'existence présentent des cellules dont la nutrition est viciée; ces cellules peuvent sécréter elles-mêmes des substances qui attirent les leucocytes. Si de tels produits existent en quantité suffisante, les globules blancs sont retenus loin des microbes, absolument comme chez les animaux auxquels on injecte des cultures stérilisées. L'attraction des leucocytes par les produits morbides de cellules lésées est suffisamment mise en lumière par l'anatomie pathologique. Ainsi, pour ne citer qu'un exemple, les nodules cancéreux en voie de dégénérescence sont toujours entourés d'une zone d'infiltration leucocytaire.

Déjà l'année dernière (35), nous avons démontré directement la sécrétion des substances attirantes par l'organisme malade : « Ces lésions cellulaires, nous les produisons chez la grenouille en injectant sous la peau du dos 1cc de bile de bœuf; dès le lendemain, l'animal est mort. Nous recueillons dans des tubes capillaires le liquide qui a transsudé dans la cavité pleuro-péritonéale. Après avoir fermé les tubes à l'une de leurs extrémités, nous les introduisons dans l'abdomen d'une autre grenouille. Vingt-quatre heures après, ils contiennent beaucoup de leucocytes. Des expériences de témoins, faites avec la lymphe normale et avec la bile de bœuf pure, donnent un résultat négatif.

L'expérience suivante est plus concluante encore.

Exp. XXI.— Le 29 avril 1891, nous épilons deux lapins A et B à l'aide d'une pâte au sulfure de sodium. La portion épilée comprend tout le ventre et tout le dos. Le 1er mai, la peau mise à nu est recouverte une couche de collodion riciné. Le 2 mai, nous appliquons une nouvelle couche de collodion, puis nous injectons sous la peau du dos du lapin A 1/4cc de cul-

ture vivante de *B. pyocyaneus*. Dès le lendemain ce lapin présente de la diarrhée. Il meurt le 9 mai.

Le lapin B (qui n'a pas reçu de culture pyocyanique) est tué le 4 mai; son sang est recueilli et placé dans la glacière. Le 6 mai, à 8 heures 30 m., le sérum, parfaitement limpide, est introduit dans les tubes capillaires; ceux-ci sont placés dans la cavité abdominale d'un nouveau lapin.

A 4 h. 30 s., les tubes capillaires sont retirés; ils contiennent un très grand nombre de leucocytes.

Quelle est la signification de cette expérience? La cause de la mort chez les animaux vernis n'est pas complètement connue. Suivant les uns, c'est la réfrigération; suivant les autres, c'est la rétention de produits toxiques qui, à l'état normal, sont éliminés par la peau. Quoi qu'il en soit, il est certain que les cellules ont excrété des produits morbides qui attirent les leucocytes et les empêchent de remplir leur rôle phagocytique au point d'inoculation. Aussi le lapin épilé et verni est-il devenu plus réceptif pour la maladie pyocyanique.

Nous croyons inutile d'insister sur les autres causes prédisposantes, le diabète, la réfrigération, le surmenage, la saignée, la section des nerfs, l'hémiplégie et le jeûne. Il est probable que dans ce cas, la présence de produits attirants intervient pour une part, et que la diminution de toutes les fonctions, y compris la fonction phagocytique, joue également un rôle.

Dans les lésions locales, telles que la contusion (Nocard et Roux, 12) et l'injection d'acide phénique dilué (Herman, 4), la prédisposition nous paraît tenir à un processus analogue. Par la contusion et par la pénétration d'acide phénique au sein des tissus, les cellules atteintes sont déviées de leur nutrition normale et leurs produits mettent en jeu le chimiotaxisme des leucocytes.

Ainsi que le supposent MM. Vaillard et Vincent (3), l'injection d'acide lactique influence l'infection d'une façon différente. Il s'agit ici d'une véritable répulsion. Les globules blancs *fuient* l'acide lactique, ainsi qu'il résulte de l'expérience suivante.

Exp. XXII. — Le 8 avril 1891, à 8 h. m., nous introduisons dans la cavité abdominale d'un lapin quatre faisceaux de tubes capillaires, contenant :

α) Une culture pyocyanique vivante.

β) La même culture additionnée d'acide lactique en quantité telle que la concentration de l'acide soit de 1 p. 1,000;

γ) La même culture additionnée d'acide lactique en quantité telle que la concentration de l'acide soit de 1 p. 500;

δ) La même culture additionnée d'acide lactique en quantité telle que la concentration de l'acide soit de 1 p. 100.

A 4 h. s., les tubes sont retirés.

α) Les tubes contiennent un très grand nombre de leucocytes;

β) *Idem ;*

γ) Les tubes ne renferment pas de leucocytes;

δ) *Idem.*

Les leucocytes n'entrent donc pas dans les tubes où l'acide lactique est à 1 pour 500 et à 1 pour 100. Pourtant ces tubes renferment la culture pyocyanique qui les attire fortement ; si les globules blancs n'y pénètrent pas, c'est qu'à ce degré de concentration, l'acide lactique les repousse énergiquement. Ici nous sommes en droit de conclure à la propriété *négativement chimiotaxique* de l'acide lactique. C'est jusqu'à présent le seul corps connu qui possède ce pouvoir : les expériences de M. Gabritchewsky (36) ne lui permettent pas de conclure à l'existence de corps négativement chimiotaxiques ; telles qu'il les a conçues, elles prouvent simplement que certains corps *n'attirent pas* les globules blancs ; rien ne prouve qu'ils les repoussent. Or les termes « négativement chimiotaxiques » impliquent nécessairement une répulsion. Peut-être les toxines du tétanos jouissent-elles aussi de cette propriété ; M. Vincent (44) le suppose, mais ne le démontre pas.

Il est encore une cause prédisposante que nous n'avons pas étudiée jusqu'à présent. C'est l'anesthésie. M. Wagner (15) et M. Platania (26) ont conféré le charbon aux volailles à l'aide du chloral. De l'expérience suivante on peut conclure que le chloral anesthésie les globules blancs et les rend inaptes à se porter au-devant des microbes.

Exp. XXIII. — Le 31 mai 1890, à partir de 8 heures du matin jusque vers midi, nous injectons dans le tissu cellulaire d'un lapin deux grammes de chloral en doses fractionnées. A 8 h. 40 du matin, nous plaçons dans l'abdomen du lapin des tubes contenant la sérosité extraite des muscles d'un lapin mort du charbon symptomatique.

A 4 h. 40 du soir, les tubes sont retirés; ils ne contiennent pas de leucocytes.

Il est logique de supposer que l'inactivité des globules blancs est due à leur anesthésie par le chloral.

M. Bouchard (2) a constaté que l'injection de produits solubles du microbe du choléra des poules favorise le développement de la maladie pyocyanique. Pourtant il est bien démontré que ces produits n'attirent pas les leucocytes; peut-être agissent-ils en les anesthésiant, ce qui n'aurait rien d'étonnant en présence de l'influence narcotique qu'ils exercent sur l'organisme animal.

On a étudié dans ces derniers temps deux causes prédisposantes qui agissent d'une façon toute spéciale : l'ablation de la rate et l'injection intra-vasculaire de poudres inertes très fines. Ces recherches sont dues principalement à M. Bardach. Cet auteur montre que le chien, animal naturellement réfractaire au charbon, peut devenir charbonneux après l'enlèvement de la rate (45), ce qu'il explique par le fait que cet organe constitue l'un des appareils phagocytaires les plus actifs.

M. Bardach a répété ses expériences avec le même résultat sur le lapin. Cet animal résiste au virus atténué du charbon; il y succombe lorsqu'il est dératé (46).

Il constate aussi que le chien devient réceptif pour le charbon lorsqu'on lui injecte au préalable dans la circulation de grandes quantités de poudres inertes très fines (45). La diminution de la résistance se comprend aisément dans ce cas. Les phagocytes, bourrés de particules solides, ne sont plus capables d'en absorber davantage; les bacilles restent en dehors des cellules et se développent à l'aise.

Dans notre notice de l'année dernière (35), nous émettions l'avis que, chez l'animal vacciné, les leucocytes sont devenus plus sensibles aux produits du microbe contre lequel il a acquis l'immunité. Nous nous fondions sur des expériences de M. Bouchard (47). Ce savant a montré que l'injection sous-cutanée de bacilles pyocyaniques détermine chez le lapin vacciné une lésion locale avec immigration de nombreux leucocytes. Cette même injection ne produit aucune lésion locale chez les sujets ordinaires; elle donne lieu d'emblée à l'infection générale.

Un fait de même ordre a été observé depuis par M. Sawtschenko (48) pour le charbon du pigeon.

Notre opinion se trouve confirmée par de nouvelles recherches de M. Bouchard (2), recherches dont cet auteur tire la conclusion que voici : « Ces mêmes matières vaccinantes ont un autre effet sur l'organisme : elles changent l'activité de ses cellules, de telle sorte que, même après l'élimination des matières vaccinantes, les leucocytes, en présence du même microbe, effectuent plus abondamment leur diapédèse et accomplissent avec plus d'énergie leur fonction de phagocytes. » Après que les produits microbiens ont été éliminés, les leucocytes restent donc plus sensibles.

Nous disions également (35) : « Il nous semble probable que ces substances (microbiennes) interviennent dans la prolifération cellulaire qui accompagne l'inflammation : en solutions très diluées, elles activeraient la division et la multiplication des éléments qu'elles baignent. » Des expériences récentes confirment cette vue théorique : M. von Limbeck (49) constate que chez les malades atteints d'affections contagieuses, entre autres de pneumonie croupale, le nombre des leucocytes du sang est fortement augmenté. Il essaie de reproduire expérimentalement ce phénomène; il injecte à des chiens, dans l'articulation du genou, des cultures de microbes, et en particulier de staphylocoques pyogènes : le nombre des leucocytes du sang devient beaucoup plus considérable qu'à l'état normal.

M. Buchner (38) a montré que l'injection intra-veineuse des protéines isolées par lui provoque chez le lapin une multiplication très notable des globules blancs.

Voici les conclusions qui se dégagent, croyons-nous, de nos recherches sur la prédisposition aux maladies infectieuses, c'est que l'augmentation de la réceptivité peut tenir à diverses causes dont voici quelques-unes :

1° Les leucocytes baignent dans des humeurs chargées de produits sécrétés soit par des microbes, soit par des cellules altérées; — ces produits attirent les phagocytes, les retiennent dans les tissus et entravent leur migration vers les points menacés, alors qu'à l'état normal les phagocytes se dirigent vers ces points en vertu de leur chimiotaxisme;

2° Les leucocytes sont repoussés des endroits envahis par les

microbes pathogènes à cause de la présence de produits qui exercent sur eux une action négativement chimiotaxique;

3° Les anesthésiques facilitent ou aggravent l'infection en supprimant l'iritabilité des phagocytes.

Le présent travail a été fait au laboratoire de physiologie de l'Institut Solvay. (Université libre de Bruxelles.) Nous sommes heureux de pouvoir exprimer toute notre reconnaissance à M. le professeur P. Héger, dont les conseils nous ont été si utiles.

BIBLIOGRAPHIE

1. G. H. Roger. *De la production par les microbes pathogènes de substances solubles qui favorisent leur développement.* (*C. R. Soc. Biol.*, 27 juillet 1889.)

2. Ch. Bouchard. *Actions des produits sécrétés par les microbes pathogènes.* (Paris, 1889.)

3. Vaillard et Vincent. *Contribution à l'étude du tétanos.* (*Ann. Inst. Pasteur*, 25 janvier 1891.)

4. M. Herman. *De l'influence de quelques variations du terrain organique sur l'action des microbes pathogènes.* (*Ann. Inst. Pasteur*, 25 avril 1871.)

5. C. Courmont. *Substances solubles favorisantes fabriquées par un bacille tuberculeux.* (*C. R. Soc. Biol.*, 21 décembre 1889.)

6. A. Rodet et J. Courmont. *Étude sur les produits solubles favorisants sécrétés par le staphylocoque pyogène.* (*C. R. Soc. Biol.*, 21 mars 1891.)

7. E. Metchnikoff. *Le charbon des pigeons.* (*Ann. Inst. Pasteur*, 25 février 1890.)

8. G. H. Roger. *Inoculation du charbon symptomatique au lapin.* (*C. R. Soc. Biol.*, 2 février 1889.)

9. G. H. Roger. *Deuxième note sur l'inoculation du charbon symptomatique au lapin.* (*C. R. Soc. Biol.*, 30 mars 1889.)

10. A. Monti. *Influenza dei prodotti tossici dei saprofiti nella restituzione della virulenza ai microparasiti attenuati.* (*Rendiconto d. R. Acc. d. Lincei.* vol. V, f. 7, 1889.)

11. Ch. Bouchard. *Thérapeutique des maladies infectieuses.* (Paris, 1889.)

12. Nocard et Roux. *Sur la récupération et l'augmentation de la virulence de la bactérie du charbon symptomatique.* (*Ann. Inst. Pasteur*, 25 juin 1887.)

13. Platania. *Contributo allo studio dell'etiologia delle pulmonite.* (*Giorn. intern. d. Sc. med.*, 1889, f. 5.)

14. Charrin et Roger. *Influence de la fatigue sur l'évolution des maladies microbiennes.* (*C. R. Soc. Biol.*, 24 janvier 1890.)

15. K. E. Wagner. *Le charbon des poules.* (*Ann. Inst. Pasteur*, 25 septembre 1890.)

16. A. Charrin. *Influence des modifications générales et locales du terrain sur le développement de l'infection.* (*C. R. Soc. Biol.*, 30 mars 1889.)

17. Canalis et Morpurgo. *Influence du jeûne sur la disposition aux maladies infectieuses.* (Rome, 1890. Résumé dans les *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 25 septembre 1890.)

18. Serafini. *Sulla causa delle febre nella pulmonite fibrinosa generata dal microorganismo di Friedländer.* (*Riv. intern.*, 1889.)

19. S. Arloing. *Les Virus.* (Paris, 1891.)

20. A. Charrin et A. Ruffer. *Influence du système nerveux sur l'infection.* (*C. R. Soc. Biol.*, 9 mars 1889.)

21. G. H. Roger. *Influence des paralysies vaso-motrices sur l'évolution de l'érysipèle expérimental.* (*C. R. Soc. Biol.*, 3 mai 1890.)

22. Ch. Feré. *Influence du système nerveux sur l'infection.* (*C. R. Soc. Biol.*, 27 juillet 1889.)

23. Arloing, Cornevin et Thomas. *Le charbon symptomatique du bœuf.*

24. Bujwid. *Traubenzucker als die Ursache der Eiterung neben Staphylokokkus aureus.* (*Centralb. f. Bacter. u. Paras.*, Bd IV, 1888, n° 19.)

25. Leo. *Beitrag zur Immunitätslehre.* (*Zeitschr. f. Hygiene*, Bd VII, 1889, p. 505.)

26. Platania. *Dell' influenza del sistema nervoso sulle infezione.* (*Giorn. internaz. d. Sc. med.*, 1889, n° 12.)

27. Grawitz. *Ueber die Ursache der subcutane Entzündung und Eiterung.* (*Virchow's Arch.*, Bd CVIII, 1886, S. 67.)

28. Grawitz. *Ueber die Bedeutung des Cadaverins* (*L. Brieger*) *für das Entstehen von Eiterung.* (*Virchow's Arch.* Bd CX, 1887, S. 1.)

29. Scheuerlen. *Weitere Untersuchungen uber die Entstehung der Eiterung, ihr Verhältniss zu den Ptomaïnen und zur Blutgerinnung.* (*Fortschritte der Medicin*, 1887, n° 23, S. 762.)

30. Christmas-Dirckinck-Holmfeld. *Recherches expérimentales sur la suppuration.* (Paris, 1888.)

31. J. Karlinski. *Ueber die neueren Ansichten über die Entstehung von Eiterung.* (Résumé dans *Centralb. f. Bacter. und Paras.*, 18 août 1889.)

32. Steinhaus. *Die Aetiologie der acuten Eiterungen.* (Leipzig, 1889.)

33. Th. Leber. *Die Bedeutung der Bacteriologie für die Augenheilkunde.* (Ber. des VII. period. internat. Opthalmologencongresses zu Heidelberg, 1888.)

34. Pekelharing. Communication faite au deuxième Congrès néerlandais des sciences physiques et médicales tenu à Leyde en 1889. (Voir la *Semaine médicale*, 29 mai 1889.)

35. J. Massart et Ch. Bordet. *Recherches sur l'irritabilité des leucocytes.* (*Journal de médecine, de chirurgie et de pharmacologie*, 20 février 1890.)

36. Gabritchewsky. *Sur les propriétés chimiotaxiques des leucocytes.* (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 25 juin 1890.)

37. H. Buchner. *Ueber Eiterungserregende Stoffe in der Bacterienzelle.* (*Centralbl. f. Bacter. u. Paras.*, 5 Sept. 1890.)

38. H. Buchner. *Die Chemische Reizbarkeit der Leucocyten und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung.* (*Berl. Klin. Wochenschr.*, 1890, n° 47.)

39. Ch. Bouchard. *Essai d'une théorie de l'infection.* (*Verhandlungen des X. internationalen medicinischen Congresses*, Berlin, 1890.)

40. E. Metchnikoff. *Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes.* (*Annales de l'Inst. Pasteur*, 25 juillet 1887.)

41. A. Charrin et N. Gamaleia. *Sur l'inflammation.* (*C. R. Soc. Biol.*, 5 juillet 1890.)

42. A. Charrin et Gley. *Recherches expérimentales sur l'action des produits sécrétés par le bacille pyocyanique sur le système nerveux vaso-moteur.* (*Arch. de physiol. norm. et pathol.*, octobre 1890.)

43. Pfeffer. *Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize.* (*Arb. a. d. bot. Inst. z. Tübingen*, Bd. I, p. 363.)

44. H. Vincent. *La pathogénie du tétanos.* (*Rev. gén. des sciences pures et appl.*, 15 mai 1891.)

45. J. Bardach. *Recherches sur le rôle de la rate dans les maladies infectieuses.* (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 25 novembre 1889.)

46. J. Bardach. *Recherches sur la fonction de la rate dans les maladies infectieuses*, 2e mémoire. (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 25 janvier 1891.)

47. Ch. Bouchard. *Rôle et mécanisme de la lésion locale dans les maladies infectieuses.* (La *Semaine médicale*, 6 novembre 1889.)

48. J. Sawtschenko. *Zur Frage über die Immunität gegen Milzbrand.* (*Centralbl. für Bacter.*, 18 avril 1891.)

49. R. V. Limbeck. *Klinisches und Experimentelles über entzündliche Leukocytose.* (*Zeitschr. f. Heilkunde*, Bd X.)

RECHERCHES SUR LE PARASITE

DES

FIÈVRES PALUDÉENNES IRRÉGULIÈRES

PAR M. N. SAKHAROFF.

Avec la planche XII.

Dans une étude sur la malaria, publiée en langue russe, j'ai indiqué l'existence, dans le sang des malades atteints de la fièvre paludéenne irrégulière, d'un parasite singulier, que sa forme et son développement distinguent de celui des fièvres régulières, qui ne lui ressemble qu'à l'état amiboïde. C'est un petit corps pâle, enfermé dans l'hématie, doué de mouvements amiboïdes, et ayant une forme ronde à l'état de repos. Après coloration par le bleu de méthylène, il se présente comme un anneau avec une granulation au centre ou plus souvent aux bords de l'anneau.

Après les travaux de MM. Celli, Guarnieri, Grassi, Feletti et Romanowsky, cette granulation doit être considérée comme un nucléole, et le cercle clair qui l'entoure comme un noyau en forme de vésicule. J'ai présenté l'automne dernier, à la Société médicale impériale du Caucase [1], des préparations coloriées par une solution aqueuse de violet de gentiane où ce nucléole se colore d'une façon très intense en quelques minutes [2]. Il est facile, avec cette couleur, de découvrir dans le sang des formes amiboïdes non pigmentées, qui sont alors très visibles sur le fond de l'hématie faiblement colorée (V. Phot. I), et j'ai pu en trouver promptement dans des cas où il y en avait peu, et où la

1. *Malaria sur le chemin de fer transcaucasien*, avec 12 photogravures, 1889.
2. Il faut laver, avant coloration, la préparation avec de l'eau distillée, pour éviter tout précipité.

teinture par le bleu de méthylène ne m'avait donné aucun résultat.

En se développant, cet état amiboïde subit les modifications suivantes : il y paraît des grains pigmentés; la mobilité cesse graduellement, et la forme devient ronde. Les grains se réunissent et se fondent en un amas placé sur le côté ou le milieu du parasite, dont on ne voit plus le noyau. Pendant ce temps, le parasite prend toute sa grandeur, sans jamais atteindre pourtant celle de l'hématie, dont une portion notable reste inoccupée. Par sa petitesse et la disposition de son pigment, ce parasite se distingue nettement des autres formes malariques.

Après un temps de durée incertaine, la scission du parasite commence. Avec l'espèce observée par MM. Marchiafava et Celli, ces savants croient que la scission se fait dans les organes intérieurs, car ils n'ont que très rarement observé des formes de division dans le sang retiré du doigt. Avec celle que je décris, j'ai au contraire observé deux fois un grand nombre de ces formes dans le sang du doigt, ce qui est un nouveau caractère différentiel.

Au moment de la scission des parasites des fièvres régulières, il ne reste d'ordinaire rien de l'hématie envahie, et même sa disparition peut servir à prédire le commencement de la scission. Le parasite des fièvres irrégulières se divise en 4 à 16 éléments disposés autour ou à côté du petit amas de pigment, et ressemble par là à l'autre, mais il en diffère en ce que sa scission se fait à l'intérieur de l'hématie, dont une partie considérable persiste, comme le montrent les photogrammes 2 et 3.

Après la scission, les éléments qui en résultent sortent de l'hématie, et on les trouve libres dans le sang, ou enfermés avec des amas de pigment dans les leucocytes. Il est intéressant de remarquer qu'on ne trouve que beaucoup plus rarement, dans les leucocytes, les autres stades de développement.

Telle est la marche du développement des parasites des fièvres irrégulières. Je l'appelle *normale*, pour pouvoir la distinguer des variations suivantes :

1° Quelquefois cette marche est accélérée, et le parasite commence à se diviser avant d'être mûr et d'avoir formé son pigment;

2° Quelquefois au contraire la marche se complique : des formes nouvelles (corps en croissant) apparaissent, et la maladie prend un cours chronique. L'intérêt théorique et pratique de ce dernier cas m'oblige à m'y arrêter.

Dans son étude sur la malaria [1], le Dr Canalis affirme que les corps en croissant proviennent des amibes des fièvres irrégulières, en s'appuyant sur ce qu'on en trouve toujours dans le sang des malades ayant subi un accès de cette fièvre, et dont le sang avait présenté de ces formes. Comme d'après lui l'apparition de ces corps en croissant est le prodrome d'un nouvel accès, il s'ensuit que les fièvres irrégulières doivent récidiver aussi, ce qui s'accorde avec les observations cliniques. Il considère donc ces corps en croissant comme caractéristiques de toutes les fièvres irrégulières, et en fait une espèce distincte des deux espèces admises par Golgi pour les fièvres régulières.

J'ai étudié pendant cet été le sang de presque tous les malades de fièvres irrégulières à l'hôpital du chemin de fer à Tiflis, et je me suis bien convaincu : 1° que chez la majorité le progrès n'allait pas jusqu'au développement des corps en croissant, quoique au début les parasites de la fièvre irrégulière se trouvassent parfois en grand nombre; 2° que les récidives sont rares chez les malades dont le sang présentait des corps en croissant. J'ai dit, dans mon étude de l'an dernier, que j'avais eu la chance d'observer pendant 15 jours des malades avec ces corps en croissant, et qui pourtant n'ont manifesté aucune élévation de température. Les corps en croissant diminuaient graduellement, et disparaissaient sans laisser de traces ; 3° enfin on trouve de ces corps chez les malades qui avaient subi une fièvre irrégulière, tandis qu'ils sont à l'état d'exception dans le cours des fièvres régulières. Aussi leur liaison avec les amibes des fièvres régulières n'est pas aussi simple que le pense M. Canalis.

Pour éclaircir cette question, je me suis mis à étudier les formes intermédiaires des corps en croissant. Les photogrammes en représentent qui n'ont pas atteint leur forme bien connue et

1. *Sur l'infection malarique.* — Forschritte d. Medizin, 1889, nos 8 et 9.

caractéristique, et qui sont ovales avec des bouts aigus ou arrondis, et du pigment dispersé partout [1].

Les corps en croissant les plus jeunes n'ont pas de pigment. Leur forme permet-elle de les distinguer des amibes des fièvres irrégulières? Le Dr Canalis croit que non, et que toutes ces formes ont un stade amiboïde commun. Mais je considère le fait comme peu probable, car 1° on rencontre de petites amibes fusiformes non pigmentées; 2° MM. Celli et Guarnieri [2] ont décrit une segmentation de la plasmodie en éléments qui étaient déjà fusiformes, et croient que ces derniers sont destinés à devenir des corps en croissant. Je crois donc que tous les stades de développement de corps en croissant doivent être séparés de ceux des formes des fièvres irrégulières.

Que deviennent ces corps en croissant? L'observation montre qu'ils se transforment peu à peu en corps ovales ou ronds.

C'est à ce moment que commence l'apparition de la forme la plus intéressante, celle qui est munie de filaments mobiles. Je me suis convaincu que cette forme est beaucoup plus fréquente que je ne l'avais cru autrefois, et qu'elle manque rarement quand il y a dans le sang des corps ronds, issus des corps en croissant.

Cette année j'ai eu l'occasion d'observer le procédé de la formation des filaments mobiles et de confirmer ainsi les données de M. Laveran. Voici comment j'ai fait l'observation : ayant trouvé dans un sang un corps rond avec le pigment en forme d'anneau (c'est le stade le plus mûr des corps en croissant), je l'ai observé pendant plusieurs minutes. Ce corps était immobile : seuls les grains de pigment remuaient un peu. Tout à coup les contours de ce corps commencèrent à s'agiter; et à la périphérie se forma une saillie qui s'allongea, et devint en quelques secondes un long filament animé de mouvements énergiques. Trois autres filaments se formèrent en même temps sur trois autres points.

On a souvent remarqué que ces filaments ne s'observent guère qu'un quart d'heure après qu'on a fait la préparation de sang, et j'ai observé le même fait. Je suis porté à croire que

1. Ce n'est que dans les formes mûres que les grains de pigment occupent le milieu de la plasmodie, comme dans les dessins de M. Canalis.

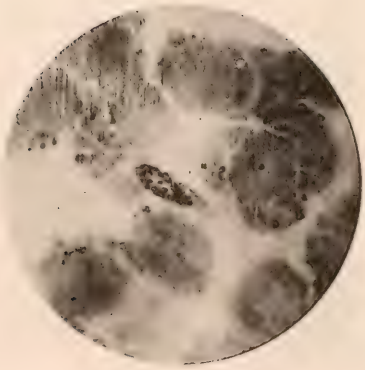
2. *Sur l'étiologie de l'infection malarique*, 1888, p. 9.

1

2

4

3



Héliotypie G. Pilarski Gentilly.

ces filaments ne se forment qu'en dehors de l'organisme et sous l'influence de l'irritation provoquée par l'abaissement de température.

Leur apparition commence simultanément sur divers points de la préparation, et comme leurs mouvements cessent bientôt, il faut, quand on veut les colorer, bien saisir le moment où ils sont le plus nombreux.

Voici le procédé qui, après de nombreux essais infructueux, m'a permis de colorer assez nettement ces filaments pour pouvoir les photographier. Avec le sang des malades chez lesquels j'avais déjà trouvé ces filaments, je faisais une série de préparations sur lamelle, dont quelques-unes étaient portées de suite dans une chambre humide, et dont une autre, vaselinée sur les bords, est soumise à l'examen microscopique. On y suit la transformation en corps ovales des corps en croissant, et la disposition en couronne du pigment de ces corps ovalaires. On rencontre alors bientôt des corps avec des filaments mobiles, on attend quelque temps pour laisser leur nombre s'augmenter, et on commence alors le traitement des préparations laissées dans la chambre humide : on en retire la lamelle en la faisant glisser, on sèche, on fixe et on colore avec une solution aqueuse de violet de gentiane. Les filaments se colorent intensivement et de la même couleur que le protoplasma du parasite, qui devient assez foncé pour que les grains de pigment n'y soient plus distincts.

Mes essais de culture du parasite malarique sur des milieux nutritifs ont tous échoué. Il en a été de même des ensemencements sur des poules, qu'on dit souffrir, au Caucase, des fièvres paludéennes. Je n'ai jamais rien trouvé dans le sang des poulets ; mais sur des oies malades qu'on m'avait apportées des stations du chemin de fer où les fièvres paludéennes sont le plus pernicieuses, j'ai trouvé un parasite spiraliforme non encore décrit et sur lequel je reviendrai.

EXPLICATION DE LA PLANCHE.

Fig. 1. États jeunes du parasite avec noyau et nucléole.
Fig. 2. État amiboïde.
Fig. 3. Transformation en croissant.
Fig. 4. Croissant développé.

ÉTUDE SUR LA PNEUMONIE FIBRINEUSE[1]

(2e MÉMOIRE[1].)

PAR M. N. TCHISTOVITCH[2].

DU NOMBRE DES GLOBULES BLANCS DU SANG DANS LA PNEUMONIE.

Le nombre des globules blancs chez les pneumoniques, ainsi que l'ont démontré MM. Halla[3], Toumas[4], Hayem[5], von Limbeck[6], Ouskoff[7], Kikodze[8], Pée[9] et autres, est notablement augmenté, souvent double et quelquefois triple du nombre normal.

Cependant il y a des exceptions. M. Kikodze, qui travaillait au laboratoire de M. Ouskoff, a observé le fait très important que, dans les cas de pneumonie à terminaison fatale, on n'a point de leucocytose. De plus, Kikodze observa que dans l'érysipèle l'augmentation du nombre de leucocytes est beaucoup plus prononcée dans les cas bénins. L'étude de la morphologie du sang dans la pneumonie, et peut-être bien aussi dans d'autres maladies infectieuses, peut donc avoir une valeur non seulement de diagnostic, mais encore de pronostic.

Pour élucider autant que possible ces faits intéressants, je les ai étudiés expérimentalement à propos de la pneumonie.

J'ai fait une série d'expériences pour me rendre compte de la corrélation entre le degré de la virulence des diplococcus de

1. Travail fait au laboratoire de la clinique médicale de l'Académie de médecine à Saint-Pétersbourg.
2. Voir les *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IV, n° 5.
3. Halla, *Zeitschrift für Heilkunde*, IV Bd, p. 198. Prag. 1883.
4. Toumas, *Gazette hebdomad. clin. de Botkine*, 1885, p. 392 (en russe).
5. Hayem, *Du sang et de ses altérations anat.* Paris, 1889.
6. Limbeck, *Zeitschr. f. Heilkunde*, t. X.
7. Ouskoff, *Le sang considéré comme tissu.* Saint-Pétersbourg, en russe.
8. Kikodze, *Anatomie pathologique du sang dans la pneumonie.* Thèse de Saint-Pétersbourg, 1890.
9. Pée, *Recherches sur la leucocytose.* Berlin, 1890.

la pneumonie (*diplococcus pneumoniæ* de Fraenkel et de Weichselbaum, *streptococcus lanceolatus Pasteuri* de Gamaleïa) et des changements du nombre des leucocytes dans le sang des animaux inoculés par ces microbes.

Mes expériences ont été faites sur des lapins, auxquels j'injectais des cultures plus ou moins virulentes de diplococcus dans du bouillon.

Pour obtenir des cultures de diplococcus, j'inoculais sous la peau du lapin ou de la souris des expectorations pneumoniques obtenues avant la crise. Quand l'animal succombait, son sang pris dans le cœur présentait une culture pure de diplococcus et était ensemencé dans du bouillon de veau peptonisé.

Après 24 heures dans l'étuve à 38°, le bouillon devenait tout à fait trouble à cause de la quantité de diplococcus qui s'y développaient.

M'étant assuré de la pureté de la culture, je m'en servais pour mes expériences. Cette culture laissée à l'étuve à 38° perd de jour en jour sa virulence. Ainsi, en m'en servant à différentes périodes après l'ensemencement dans le bouillon, j'avais des cultures de différentes virulences[1]. Quand j'avais besoin de microbes particulièrement virulents, je me servais du sang de la cavité cardiaque, pris avec une seringue stérilisée, chez un lapin mort promptement après l'inoculation de diplococcus, après m'être préalablement assuré que ce sang ne contenait que des diplococcus de la pneumonie.

Les expériences se faisaient de la manière suivante :

Je comptais la quantité de leucocytes dans le sang du lapin soumis à l'expérience pendant quelques jours avant l'inoculation, en me servant du sang pris dans une des petites artères de l'oreille, puis j'injectais une culture plus ou moins virulente sous la peau ou bien dans le poumon, et j'étudiais le sang à différentes époques jusqu'au rétablissement ou jusqu'à la mort de l'animal.

Pour déterminer le nombre de leucocytes dans un millimètre cube, je diluais le sang à 20 fois son volume par le liquide de Thoma (1/3 0/0 d'acide acétique), avec un mélangeur de M. Potain, et je comptais les globules blancs d'après Thoma à l'aide de l'appareil de Thoma et Zeiss.

1. Je ne m'arrête pas sur la description plus détaillée de ces cultures, parce que j'en ai déjà parlé dans mon mémoire précédent. Voir ces *Annales*, V, IV, n° 5.

Les résultats ont été les suivants : en employant des cultures affaiblies, que les lapins supportaient bien, j'obtenais chaque fois une augmentation du nombre de leucocytes, qui était plus ou moins notable et durait un ou deux jours, après lesquels elle disparaissait avec le rétablissement de l'animal.

Au contraire, après l'inoculation de cultures virulentes, déjà après quelques heures, je trouvais une diminution de la quantité des leucocytes et cela progressivement jusqu'à la mort. Cette diminution des leucocytes ne peut être attribuée exclusivement aux phénomènes de l'agonie et à l'entassement des leucocytes dans différents organes par suite de la faiblesse du cœur et du ralentissement de la circulation, parce qu'elle se manifeste souvent très tôt, quand l'animal est encore vif, et a une circulation sanguine énergique.

La marche de la maladie dépendait de la virulence de la culture et de la résistance de l'animal. La même culture qui tuait un petit lapin était bien supportée par un lapin adulte ; elle provoquait chez le premier une diminution progressive du nombre de leucocytes dans le sang et une augmentation chez le second. Je n'ai pu constater aucune corrélation notable entre la richesse ou la pauvreté de leucocytes dans le sang avant l'inoculation, et la marche de la maladie.

Quelquefois, l'issue de la maladie ne pouvait être prévue dès le début. Ainsi, dans un cas, le lapin après l'inoculation présentait des phénomènes graves avec diminution du nombre de leucocytes, puis je constatai un accroissement de leucocytes et l'animal guérit.

On ne peut encore dire à quoi tient cette différence d'effet des cultures atténuées ou virulentes sur le sang, mais elle pourrait bien provenir de ce que les produits des diplococcus, virulents pour tel animal, ont une influence dépressive sur les leucocytes et leurs organes producteurs, tandis que les produits des diplococcus atténués possèdent une action chimiotactique par rapport aux leucocytes (chimiotaxie négative et positive de M. Pfeffer).

Il est plus difficile d'expliquer le cas intermédiaire où je constatais d'abord une action dépressive, le nombre de leucocytes diminuant pendant quelque temps après l'inoculation, pour croître ensuite avec la guérison de l'animal. Mais la science

entre à peine dans l'étude du phénomène, qui d'ailleurs n'est pas absolument régulier et constant. C'est ainsi que dans une des expériences de von Limbeck, un lapin inoculé est mort avec un accroissement considérable de leucocytes.

Les changements que nous venons de décrire dans le sang des animaux inoculés sont pleinement en accord avec les faits exposés dans mon travail sur les phénomènes phagocytaires dans la pneumonie fibrineuse. En comparant ces faits avec ceux de mon travail précédent, nous trouvons que dans la pneumonie à marche favorable, le sang abonde en leucocytes et en même temps on constate le phénomène de phagocytose dans les poumons. C'est l'inverse dans la pneumonie à marche maligne avec terminaison fatale, le sang est pauvre en leucocytes et la phagocytose n'existe pas ou bien est peu accentuée.

APPENDICE

CAS D'INJECTION DE CULTURES ATTÉNUÉES AVEC GUÉRISON.

N° 1. Lapin mâle de moyenne taille.

7 juin 1890, à 3 heures	9,059	leucocytes dans un mm. c. de sang.
10 juin 1890, à 3 heures	9,527	leucocytes.
11 — — —	8,593	—
12 — — 7 heures du soir	10,751	—

A 8 heures du soir, injection de 0cc,5 de culture tout à fait faible de diplococcus sous la peau. La culture était restée 9 jours dans l'étuve après l'ensemencement.

13 juin 1890, à 2 heures	17,098	leucocytes.
14 — — —	9,220	—
15 — — —	10,023	—

N° 2. Petit mâle de 1,100 grammes.

11 octobre 1890, à 2 heures	7,310	leucocytes.
14 — — —	7,013	—

A 4 heures, injection dans le poumon de 1/2 centimètre cube d'une culture de diplococcus âgée de 4 jours.

15 octobre 1890, à 4 h. 40.	7,695	leucocytes.
17 — — —	7,327	—

Le lapin est bien portant.

21 octobre 1890, à 4 h. 40.	7,680	leucocytes.
30 — — —	6,753	—

A 4 heures, injection dans le poumon de 1/2 c. c. d'une culture de 3 jours.

31 octobre 1890, à midi (après 20 h.)	11,503	leucocytes.
1er novembre — à 4 h. 30	7,500	—

Le lapin guérit complètement.

N° 3. Gros lapin.

11 février 1891, à 2 heures	5,120	leucocytes.
12 — — —	5,905	—

Injection d'un centimètre cube de culture de 4 jours sous la peau.

13 février 1891, à 3 heures	6,451	leucocytes.
14 — — —	10,444	—
15 — — —	5,500	—
16 — — 8 —	5,874	—

INOCULATION DE CULTURES PLUS VIRULENTES, MAIS AVEC GUÉRISON.

Lapin de 1,372 grammes.

30 mai 1891, à 3 h. 30	7,272	leucocytes.
31 — — 11 heures du matin	6,157	—
1er avril — 10 — —	7,809	—

A 10 h. 10, injection sous la peau de 0cc,5 de culture sur bouillon, de 1 jour. Le lapin dont le sang fut ensemencé sur bouillon pour obtenir cette culture était mort le troisième jour seulement après l'inoculation sous-cutanée d'expectoration pneumonique, dont l'expectoration ne contenait plus des diplococcus très virulents.

A 3 heures du même jour	6,800	leucocytes.
A 4 h. 30 —	7,631	—
2 avril 1891, à 10 heures du matin	4,860	—

Le lapin est triste.

2 avril 1891, à 3 h. après midi	5,034	leucocytes.
3 — — à 2 heures —	9,462	—

Le lapin va mieux.

4 avril 1891, à 11 heures du matin	9,247	leucocytes.
6 — Le lapin est tout à fait rétabli.		

EXPÉRIENCES AVEC DES CULTURES VIRULENTES A TERMINAISON FATALE.

N° 5. Lapin de moyenne taille.

23 septembre	1890,	à	3 heures	8,554 leucocytes.
26 —	—		—	9,720 —
4 octobre	—		—	9,281 —
8 —	—		—	9,426 —
9 —	—	à	3 h. 30 inoculation	dans le poumon de 0cc,5

de culture de diplococcus de 1 jours (24 heures).

A 8 heures du soir du même jour, 7,421 leucocytes.

10. Le lapin est mort pendant la nuit. Son sang contient une grande quantité de diplococcus.

N° 6. Lapin mâle de 1,115 grammes.

27 janvier	1891,	à	3 heures	6,636 leucocytes.
29 —	—		—	7,446 —
31 —	—		—	6,236 —
1er février	—		—	6,392 —

A 3 h. 35, inoculation dans le poumon de 0cc, 5 de culture de diplococcus de 2 jours.

A 9 heures du soir, 5,142 leucocytes.

2 février, le lapin est triste, ses oreilles sont cyanosées. Le sang ne coule pas de l'artère ouverte. Le sang de la veine de l'oreille contient 3,320 leucocytes dans un millimètre cube.

Le lapin meurt pendant la nuit du 4 février. On constate une masse de diplococcus dans le sang.

N° 7. Lapin de 1,472 grammes.

18 avril	1891,	à	2 heures	9,780 leucocytes.
19 —	—	à	11 — du matin	8,866 —
20 —	—		— —	11,321 —

L'oreille est hypérémiée.

A midi, inoculation sous-cutanée de 0cc, 5 de sang d'un lapin mort 48 heures après l'inoculation de culture de diplococcus. Le sang présentait une culture pure de diplococcus.

		A 2 heures du même jour	11,020	leucocytes.
		A 4 — —	8,562	—
21 avril	1891,	à 11 heures du matin	3,019	—

Le lapin est triste.

22 avril 1891, à 11 heures du matin, le lapin est trouvé mort. Son sang contient un grand nombre de diplococcus.

NOTE SUR LES FERMENTS DE L'ANANAS

PAR M. E. KAYSER.

Chaque fruit possède ses ferments spéciaux. C'est un fait depuis longtemps connu ; ainsi sur le raisin nous trouvons d'autres ferments que sur la fraise ou la pomme. En ensemençant dans un liquide sucré chacun de ces ferments, on remarque non seulement une différence dans la quantité d'alcool formée, mais on trouve au liquide fermenté un goût particulier et un parfum spécial rappelant un peu l'origine du ferment.

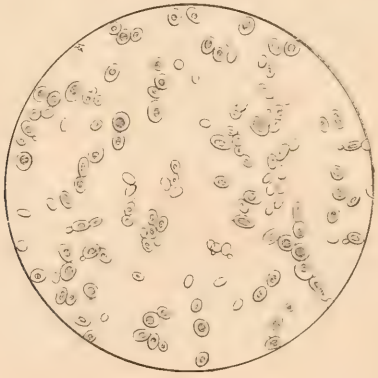


Fig. 1.

Je me suis trouvé en possession de jus d'ananas en fermentation spontanée, et il m'a semblé intéressant d'en isoler les ferments. J'en ai retiré une levure et une moisissure qui m'ont paru toutes deux mériter une étude.

Levure (Fig. 1). — La levure est formée de globules un peu allongés, quelquefois sphériques quand la levure est jeune, mais

d'ordinaire elliptiques, dont la longueur moyenne varie de 3,5 μ à 7 μ et la largeur de 2,5 μ à 5 μ ; au bout de peu de temps, tous les globules montrent des vacuoles : la levure bourgeonne à la façon des levures hautes, en donnant des chapelets de 4 ou 5 globules.

La levure soumise à l'inanition sur des blocs de plâtre, dans l'eau distillée avec un peu de lactese, dans du bouillon Liebig avec du lactose, ne m'a pas donné de spores.

Elle meurt à l'état humide vers 53-55°; à l'état sec, vers 100-105° après un chauffage de 5 minutes.

Cultivée sur gélatine, elle montre une grande tendance à s'étaler en largeur.

Ensemencée dans les liquides, elle forme voile à leur surface déjà dans les 24 heures, et souvent (ceci a lieu surtout dans les milieux légèrement acides), ce voile, au fur et à mesure que la place lui manque pour s'étendre horizontalement, se tasse au centre en un anneau de plusieurs centimètres de hauteur. Les globules de ce voile m'ont toujours paru identiques à ceux du fond, et tous mes essais pour distinguer une levure de fond et une levure de surface ont échoué.

Cette levure se distingue, entre toutes celles que j'ai pu étudier jusqu'à ce jour, par une odeur particulière qu'elle communique aux milieux solides et liquides sur lesquels elle végète ; c'est une odeur éthérée, très suave et très agréable. Quelquefois il a suffi de 2 à 3 ballons en fermentation pour répandre cette odeur non seulement dans l'étuve, mais encore dans tout le laboratoire.

Moisissure (Fig. 2). — Les filaments du mycélium sont hyalins, faiblement ramifiés, cloisonnés, à protoplasma granuleux; la largeur des filaments est de 3 à 5 μ ; les spores sont presque rectangulaires, un peu arrondies aux extrémités, et ressemblent fortement à celles d'un Oïdium ou d'une Oospora. Leurs dimensions varient de 10 à 16 μ de long sur 3 à 5 μ de large ; elles sont hyalines et remplies d'un protoplasma granuleux comme celui des filaments ; elles se produisent en courts chapelets dans l'intérieur et à l'extrémité des hyphes sporifères.

Sur les milieux solides, elle est d'aspect blanchâtre, duveteux ; ensemencée dans les liquides sucrés, elle commence par

couvrir toute la surface, mais on constate que peu à peu des morceaux de mycélium tombent au fond pour y former un dépôt floconneux un peu semblable à celui de la levure, et formé de cellules qui peuvent en effet produire de faibles quantités d'alcool.

La moisissure communique, aux milieux sur lesquels on la cultive, une odeur très fine rappelant celle si caractéristique de l'ananas; j'ai remarqué que cette odeur était surtout prononcée

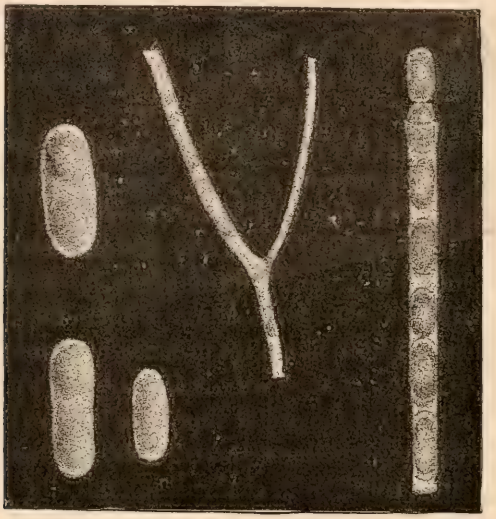


Fig. 2.

dans les solutions de glucose additionnées d'un peu de glycérine; mais elle se perd peu à peu, et, au bout de quelques mois, elle a complètement disparu [1].

J'ai ensemencé la levure et la moisissure dans différentes solutions sucrées additionnées de bouillon Liebig comme matière azotée.

La levure ne fait pas fermenter la tréhalose, la raffinose, la dulcite, la mélézitose, l'inosite, la sorbine, la dextrine. Elle y vit

1. Il convient de ne pas confondre cette moisissure avec le *Sporochisma paradoxum* décrit par M. de Seynes, qui donne des taches noires sur l'ananas envahi. M. de Seynes n'est pas arrivé à le faire pousser sur le parenchyme d'autres fruits; or, ma moisissure blanche pousse très bien sur la pomme, l'orange, des tranches de pommes de terre, etc. (Voir *Les Végétaux inférieurs*, par M. de Seynes, III, 1re partie, 1886, p. 26, pl. I, figure 23, 24 et 25, et aussi *Société mycologique de France, session cryptogamique à Paris*, octobre 1887, p. XXVI.)

à la façon des levures ordinaires dans les solutions de lactose.

Elle ne fait pas non plus fermenter la lactose, et gêne même l'action des levures qui peuvent faire fermenter ce sucre, lorsqu'elle est semée en même temps qu'elles dans la liqueur. Elle réduit à moitié ou même davantage la production d'alcool dans le même temps : cela tient sans doute à ce que le voile qu'elle forme à la surface gêne l'arrivée dans les profondeurs de l'oxygène nécessaire aux levures de lactose. C'est ainsi qu'on voit la fermentation secondaire dans un foudre de bière s'arrêter lorsqu'un voile de *mycoderma vini* se forme à la surface du liquide, et reprendre aussitôt que l'agitation a disloqué ce voile pour s'arrêter à nouveau quand il est reformé.

Quant aux solutions de saccharose, de glucose, de maltose, elles fermentent tant sous l'action de la levure que de la moisissure, mais très inégalement. Pour le montrer, j'ai ensemencé ces deux espèces microscopiques dans des liquides contenant la même quantité d'aliment azoté, et où les sucres seuls différaient. On a interrompu la fermentation au bout de 7 semaines, et analysé les liquides d'après les procédés ordinaires. Le tableau suivant donne pour chacun de ces liquides la quantité de sucre initial, de sucre restant, et l'acidité totale et volatile, exprimée en acide acétique. Tous les nombres sont évalués en grammes, et rapportés au litre.

	MOISISSURE			LEVURE		
	Sucre restant.	ACIDITÉ Totale.	ACIDITÉ Volatile.	Sucre restant.	ACIDITÉ Totale.	ACIDITÉ Volatile.
SACCHAROSE 90gr,7 par litre.	84,5	1,09	0,040	0	2,02	0,778
GLUCOSE 97gr,8 par litre.	56,8	2,10	0,068	3,1	1,86	0,488
GALACTOSE 40gr,3 par litre.	21,3	1,05	0,026	22,9	1,33	0,506
MALTOSE 101gr,8 par litre	77,1	1,08	0,027	80,1	1,40	0,930

Ce qu'il faut remarquer tout d'abord, dans ce tableau, c'est que la levure a fait fermenter presque aussi facilement la saccharose que la glucose; elle sécrète en effet de la sucrase qu'on peut retrouver facilement dans le liquide. La quantité d'alcool, qui n'est pas inscrite dans le tableau, est en rapport normal avec la quantité de sucre disparu. La levure est donc un ferment alcoolique de la saccharose et de la glucose.

Elle fait fermenter plus difficilement la galactose, plus difficilement encore la maltose, et si on ne consultait que les chiffres du tableau, on serait tenté de la rapprocher de la moisissure, qui se comporte comme elle à l'égard de ces sucres. Mais il y a une différence dont il faut tenir compte. Avec la levure, la quantité d'alcool est en rapport avec le poids de sucre disparu. Avec la moisissure, la quantité d'alcool est faible, ne dépasse guère 1 0/0. Une partie du sucre disparu n'a pas fermenté, et a servi à la formation des tissus cellulaires du végétal.

Le poids sec de moisissure récoltée est en effet toujours supérieur au poids de la levure. En particulier avec la galactose, dont 19 grammes environ avaient disparu, la culture était luxuriante ; il y avait peu d'alcool. Au contraire avec la glucose, dont 40 grammes avaient disparu, la récolte était plus faible, mais il y avait proportionnellement beaucoup plus d'alcool.

C'est la solution de saccharose dont la moisissure s'accommode le moins. Elle n'a fait disparaître que 6 grammes de sucre sans donner d'alcool. De cette différence avec la glucose, on peut conclure que la plante ne sécrète guère ou pas de sucrase. Il y en a pourtant un peu, mais bien peu dans le liquide de culture. Par contre, je n'en ai pas trouvé dans la plante, après l'avoir fait macérer dans l'eau distillée, suivant la méthode de M. Fernbach.

Enfin, en ce qui concerne l'acidité, on voit que la levure produit beaucoup plus d'acide volatil que la moisissure, qui n'en donne que des traces presque indosables. Avec l'une comme avec l'autre, l'acide formé est surtout de l'acide acétique, avec des quantités minimes d'un acide gras supérieur. Ces deux résultats sont assez surprenants en ce qui regarde la moisissure, dont l'odeur d'ananas rappelle tout à fait celle de certains éthers. Il

arrive même que cette odeur est très suave et très prononcée avec les solutions de glucose, avec lesquelles la proportion de sucre transformée en alcool est notable, comme nous l'avons vu plus haut, tandis que l'odeur est faible avec des solutions de galactose, où la plante est très prospère mais donne peu d'alcool. On pouvait donc se croire autorisé à attribuer cette odeur à la formation d'un éther à acide gras, et cela, avec d'autant plus de confiance que l'alcool odorant retiré d'une première distillation perd de son odeur si on le distille de nouveau en présence d'un alcali. Mais s'il y a un éther pareil, c'est en proportions très faibles. En tous cas, on ne retrouve pas dans le liquide l'acide correspondant.

Quant à l'acidité totale, on voit qu'elle est partout assez élevée, et même qu'elle représente plus de 1/6 du sucre disparu, avec la moisissure vivant dans la saccharose, où la plante semble souffrir, comme nous l'avons vu. Une acidité trop forte gêne la levure. En l'ensemençant, comparativement, dans deux échantillons d'eau de touraillons à 6,7 0/0 de saccharose, l'un neutre, l'autre avec 1,7 0/0 d'acide tartrique, j'ai vu que le premier fermentait beaucoup plus rapidement et avait perdu tout son sucre au bout d'un mois de fermentation, tandis qu'il n'y en avait que la moitié environ de disparu dans l'autre.

J'ai ensuite essayé la moisissure et la levure dans des jus naturels, soit séparés, soit combinés : jus de fraises, jus d'oranges, jus de pommes et jus de quelques ananas, gracieusement envoyés au laboratoire par M. P. de Monicault.

Dans le jus de fraises, renfermant à l'origine 60 0/0 de sucre (calculé en glucose), la levure a fait disparaître tout le sucre, et la moisissure les 75 0/0 au bout de deux mois; dans le jus d'oranges avec 82,2 0/0 de sucre, les deux ferments n'ont pas laissé trace de sucre au bout du même temps; les liquides avaient une odeur franchement alcoolique.

Voici les résultats obtenus avec du jus de pommes : le n° 1 se rapporte à la levure ensemencée dans du jus de pommes, agité plusieurs fois par jour pendant la durée de l'expérience; le n° 2 à la levure et le n° 3 à la moisissure ensemencées dans ce même jus de pommes et laissées toujours en repos. Les nombres sont toujours des grammes par litre.

		Témoin	1	2	3
Sucre		109,0	11,68	23,12	100,9
Acidité totale		»	3,92	4,00	2,55
Acidité volatile	Ac. acétique..	»	1,150	1,081	0,082
	Ac. butyrique.	»	»	0,079	»

L'agitation a eu pour effet d'augmenter la richesse alcoolique et de la porter de 37gr,6 à 46 grammes par litre : de plus la distillation fractionnée a démontré la présence d'un acide supérieur à l'acide acétique : je l'ai calculé comme acide butyrique ; dans le liquide ensemencé par la moisissure, l'acide volatil en faible quantité a été exprimé en acide acétique.

Du jus de pommes, ensemencé avec la levure seule, m'a donné plus d'alcool, quelquefois deux fois plus qu'ensemencé avec la levure additionnée de la moisissure. Il y a sans doute là l'influence de la privation d'oxygène que subit la levure de la part du voile superficiel. Ce qui semble l'indiquer, ce sont quelques-uns des résultats obtenus avec le jus d'ananas pur, dont il me reste à dire un mot.

J'y ai ensemencé la moisissure de l'ananas, la levure de l'ananas, une levure de Champagne et les deux levures combinées chacune séparément avec la moisissure de l'ananas.

Voici les résultats de l'étude du jus d'ananas avant et après fermentation :

	Extrait.	Sucre.
Jus initial	159,6	133,7
Levure de Champagne	30,8	3,40
Levure d'ananas	32,6	6,20
Levure de Champagne et moisissure d'ananas.	»	6,50
Levure d'ananas et moisissure d'ananas	43,8	17,10
Moisissure d'ananas	90,6	63,80

La fermentation avait duré 5 semaines et était restée pure pour les deux levures. Dans les trois ballons où j'avais introduit de la moisissure, j'ai trouvé un petit bâtonnet, mais en quantité trop faible pour modifier les résultats généraux de cette comparaison qui sont les suivants.

C'est la levure de Champagne, levure très vigoureuse, qui a poussé la fermentation le plus loin et qui a le moins souffert du voisinage de la moisissure. La levure d'ananas est presque aussi active quand elle est seule ; mais comme elle est plus aérobie, elle

a été plus incommodée du voisinage de la moisissure de l'ananas.

Cette moisissure isolée a fait disparaître la moitié environ du sucre sans donner au delà de 0,5 0/0 d'alcool. La proportion d'alcool est plus forte et plus en rapport avec la quantité de sucre disparu quand la moisissure est associée à l'une des deux levures.

Avec la levure de Champagne, l'odeur de l'alcool distillé était franchement éthylique; elle était différente et plus suave avec la levure de l'ananas; elle rappelait celle du fruit partout où la moisissure avait été présente. Aucun des liquides acides distillés ne réduisait le nitrate d'argent ammoniacal. Il n'y avait donc pas d'aldéhydes. Par contre, l'odeur disparaissait ou s'atténuait quand on distillait en solution alcaline.

En résumé, ces deux ferments, relativement peu vigoureux quand on les compare à nos levures civilisées de vin ou de bière, se distinguent facilement par le parfum et le bouquet très particuliers qu'ils communiquent aux milieux dans lesquels ils poussent. Leur combinaison avec des ferments choisis et vigoureux pourrait peut-être servir à la fabrication de liqueurs spéciales rappelant l'odeur suave de l'ananas. Voilà pour le côté pratique. Quant au côté théorique, on peut remarquer combien il est curieux de voir une moisissure qui a été rencontrée sur l'ananas présenter à un aussi haut degré l'odeur caractéristique de ce fruit.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — JUIN 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	2	3	»	1	10	»	»	1
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	1		»	9		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	4	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	6	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	12	28	»	25	52	»	8	19
Morsures aux mains — multiples	»	16			27		»	11	
Cautérisations efficaces	2	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	11	»	»	21	»	»	12	»	»
Pas de cautérisation	15	»	»	31	»	»	7	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	7	11	»	8	27	»	3	19
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	4		»	19		»	16	
Cautérisations efficaces	2	»	»	4	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	4	»	»	9	»	»	13	»	»
Pas de cautérisation	5	»	»	14	»	»	6	»	»
Habits déchirés	10	»	»	21	»	»	16	»	»
Morsures à nu	1	»	»	6	»	»	3	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	2	2	»	5	5		2	2
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	4	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	1	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Morsures à nu	2	»	»	5	»	»	2	»	»
Totaux. Français et Algériens		41	44		87	94		37	41
Totaux. Etrangers		3			7			4	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					179				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 156 fois; chats, 21 fois; cheval, 2 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

5me ANNÉE. AOUT 1891. N° 8.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR L'IMMUNITÉ

(4e MÉMOIRE)

PAR M. EL. METCHNIKOFF.

Avec la planche XIII.

IV

L'IMMUNITÉ DES COBAYES VACCINÉS CONTRE LE VIBRIO METCHNIKOWII.

I

Plusieurs observateurs ont insisté dans ces dernières années sur la différence essentielle entre l'immunité naturelle des animaux et l'immunité acquise à l'aide de vaccinations préventives. Dans cette dernière forme d'immunité, on a voulu voir surtout le résultat d'actions purement chimiques et indépendantes de toute influence cellulaire en général et phagocytaire en particulier. M. Bouchard [1], dans son discours au congrès de Berlin, a même érigé cette manière de voir en une théorie de l'immunité, d'après laquelle les vaccinations amèneraient des changements humoraux très considérables, rendant impossible le développement normal du microbe dans les liquides de l'organisme réfractaire. Parmi les faits qu'on pourrait invoquer en faveur de cette théorie, le plus remarquable est certainement celui qui a été découvert par MM. Behring et Nissen [2], dans leur travail sur les propriétés bactéricides du sérum de différentes origines. Ils ont à plusieurs reprises constaté que tandis que le sérum préparé avec du sang de cobayes neufs présentait un milieu de culture très favorable pour le *Vibrio Metchnikowii*,

1. Essai d'une théorie de l'infection, 1890.
2. *Zeitschrift für Hygiene*, t. VIII, 1890, p. 424-432.

le sérum des cobayes vaccinés contre ce microbe tuait tous les vibrions au bout de trois à cinq heures. La concordance de ce fait avec l'immunité est tellement frappante que MM. Behring et Nissen n'ont pas hésité à attribuer l'immunité acquise des cobayes uniquement à la propriété bactéricide de leur sérum.

Puisque cet exemple présente le principal argument en faveur de la théorie humorale de l'immunité, je me suis mis à l'étudier dans le but de rechercher si ce cas fait réellement une exception à la règle, ou s'il peut être rangé dans le cadre de la théorie des phagocytes.

L'objection tirée de l'immunité acquise vis-à-vis du *Vibrio M.* est d'autant plus grave pour la théorie phagocytaire que, d'après les recherches de M. R. Pfeiffer [1], les vibrions ne se trouvent jamais dans l'intérieur des phagocytes chez les cobayes vaccinés.

II

Quoique nous n'ayons aucun doute sur la réalité des faits avancés par MM. Behring et Nissen au sujet de la propriété bactéricide du sérum des cobayes vaccinés, nous avons voulu constater de nos propres yeux ce phénomène remarquable. Dans ce but nous avons retiré le sang du cœur d'un cobaye, vacciné avec des cultures stérilisées du vibrion et inoculé ensuite par une culture vivante. Le sérum, décanté au bout de deux jours et introduit dans un tube à essai, a été ensemencé avec une goutte du sang d'un cobaye mort de la septicémie vibrionienne. Le même ensemencement a été fait dans le sérum d'un cobaye neuf, non vacciné. La numération par la méthode usuelle des plaques, après ensemencement de la gélatine au moyen d'une anse de platine plongée dans le sérum des deux cobayes, a donné les chiffres suivants :

	Cobaye neuf.	Cobaye vacciné.
Plaques de contrôle, faites immédiatement après l'ensemencement du sang dans le sérum.	66 colonies. 9	57 colonies. 4
Plaques faites une heure après le début de l'expérience.	924 624	2 0.
Plaques faites six heures après le début de l'expérience.	∞ ∞	0. 0.

1. *Zeitschrift für Hygiene*, t. VII, 1889, p. 360.

Ce résultat confirme celui de MM. Behring et Nissen; il est peut-être plus remarquable encore, parce que dans mon expérience je me suis servi non du sang de pigeon, mais de celui de cobaye, et parce que la propriété bactéricide s'est déjà pleinement manifestée au bout d'une heure de séjour des vibrions dans le sérum du cobaye vacciné.

Il s'agit donc, pour le cas que nous étudions, non de faibles différences dans les cultures, comme celles qui ont été décrites par MM. Charrin et Roger [1] à propos du bacille pyocyanique ensemencé dans le sérum des lapins vaccinés, mais bien d'une propriété bactéricide tout à fait complète.

Pour appliquer les résultats de ces expériences, si démonstratives *in vitro*, à l'explication de l'immunité des cobayes vaccinés, il ne suffit pas de faire une simple déduction logique; il faut encore expérimenter sur l'animal vivant.

Dans l'observation pas à pas des phénomènes qui se passent dans l'organisme animal, les inoculations du virus dans la chambre antérieure de l'œil rendent souvent de grands services. Introduisons un peu de culture du vibrion sur gélose, dans la chambre antérieure d'un cobaye vacciné et d'un cobaye neuf, nous verrons des différences bien marquées. Bientôt après l'inoculation, il s'établit une ophtalmie franche chez les deux cobayes: la conjonctive devient œdémateuse et la cornée trouble. Déjà quatre heures après le début de l'expérience, ces phénomènes sont très manifestes. Mais si nous retirons une goutte de l'exsudat des deux yeux, nous verrons que, chez le cobaye témoin, celui-ci ne renferme que des vibrions et presque point de leucocytes, tandis que chez le vacciné il contient, à côté d'un grand nombre de vibrions, une quantité considérable de leucocytes. Parmi ces derniers on en trouve déjà quelques-uns qui renferment des vibrions dans leur intérieur. L'ensemencement de cet exsudat dans les milieux nutritifs nous prouve qu'il y existe des vibrions vivants, donnant des cultures abondantes.

Chez le cobaye témoin, les vibrions se développent sans entrave, envahissent l'organisme entier et amènent la mort en moins de vingt-quatre heures. Par contre, le cobaye vacciné,

1. Comptes rendus de la Société de Biologie, 1889.

malgré que l'ophtalmie s'accentue et aboutisse souvent à l'atrophie de l'œil, ne prend jamais la maladie mortelle. L'exsudat de la chambre antérieure se remplit de plus en plus de leucocytes qui englobent les vibrions en grande quantité. Ces derniers cependant se conservent vivants pendant un temps très long. Ainsi une goutte de l'exsudat de l'œil, retirée huit jours après l'inoculation des vibrions, a donné des cultures dans du bouillon. Une autre goutte, retirée deux jours plus tard, est restée stérile.

Les vibrions se conservent pendant une semaine dans l'œil du cobaye vacciné, mais finissent par y périr. Il y a donc une grande différence entre la vitalité de ces microbes dans l'exsudat de l'œil et le sérum préparé en dehors de l'organisme. Il faut dire cependant que l'humeur aqueuse des cobayes vaccinés donne des cultures du vibrion très abondantes, et tout à fait pareilles à celles qui se développent dans l'humeur aqueuse des cobayes non vaccinés. On pourrait donc supposer que la chambre antérieure de l'œil est un milieu spécial qui se distingue notablement des autres milieux de l'organisme.

Allant au-devant de cette objection, j'ai modifié l'expérience de la façon suivante. Après avoir introduit un peu de culture du vibrion dans la chambre antérieure d'un cobaye vacciné, j'ai produit à l'aide d'une aiguille une hémorragie de l'iris. Le sang remplit toute la chambre antérieure, et cependant les vibrions se trouvaient vivants encore 74 heures après l'inoculation, ce qui fut démontré par la culture. Le moment de la destruction définitive des vibrions n'a pas été déterminé dans cette expérience.

Les inoculations sous-cutanées du vibrion à des cobayes vaccinés démontrent aussi que ces microbes restent vivants pendant longtemps dans l'organisme réfractaire. L'introduction sous la peau d'un peu de culture du vibrion sur gélose, ou d'un exsudat riche en vibrions, provoque toujours une inflammation très marquée, accompagnée d'une exsudation liquide. Mais, comme dans le cas de l'inoculation dans l'œil, chez les cobayes vaccinés cet exsudat renferme des vibrions et un nombre considérable de leucocytes, tandis que chez les cobayes neufs cet exsudat ne contient que des vibrions, et pas du tout ou presque point de leucocytes.

Dans ces expériences, la phagocytose chez les vaccinés est manifeste dès les premières heures et devient de plus en plus

abondante avec le temps. A peu près quinze heures après l'inoculation, on ne trouve plus du tout de vibrions libres, tandis que les vibrions englobés par les leucocytes sont très fréquents. Et cependant une goutte de cet exsudat, ensemencée dans du bouillon ou dans un autre milieu nutritif, donne des cultures très abondantes.

L'exsudat, retiré même 48 heures après l'inoculation sous la peau, donne des cultures dans ces milieux. Dans une expérience avec l'exsudat retiré 89 heures après l'inoculation du vibrion, le bouillon est resté stérile, ce qui prouve que les vibrions sont détruits dans un espace de temps compris entre 48 et 89 heures de séjour sous la peau du cobaye vacciné. La durée de la vie est donc beaucoup moins longue que dans la chambre antérieure de l'œil, et pourtant elle est incomparablement plus longue que dans le sérum en dehors de l'organisme. Dans une expérience de M. Pfeiffer, l'exsudat sous-cutané d'un cobaye vacciné a donné une culture du vibrion 90 heures après l'introduction de ce microbe sous la peau de l'animal.

La survie des vibrions dans l'organisme des cobayes vaccinés est donc beaucoup plus grande que dans le sérum préparé avec le sang de ces cobayes.

Une fois habitué à vivre dans l'organisme du cobaye vacciné, le vibrion peut être très facilement cultivé dans le sang et le sérum de ces animaux, même en dehors de l'organisme. Après avoir constaté ce fait dans une série d'expériences, j'ai voulu le vérifier à l'aide de la méthode des plaques.

Un cobaye, vacciné avec des cultures stérilisées, est éprouvé par l'inoculation d'une culture vivante. Il est encore employé dans une expérience où il reçoit le virus vivant et virulent; son immunité est donc bien établie. Alors, on le sacrifie et son sang est recueilli dans un tube à essai. Le sérum de ce cobaye, ainsi que celui d'un cobaye témoin non vacciné, ont été ensemencés chacun avec une petite goutte de culture du vibrion dans le sang d'un cobaye vacciné. Le lendemain les deux sérums étaient troubles à la suite du développement abondant du vibrion. Les plaques ont donné les chiffres suivants :

	Cobaye témoin.	Cobaye vacciné.
Plaques sur gélatine préparées immédiatement après l'ensemencement.	6,720 colonies.	10,488 colonies.
Une heure après.	21 15	1,320 440
Trois heures après le début de l'expérience.	47 25	302 256
Vingt-trois heures après l'ensemencement	∞ ∞	∞ ∞

La propriété bactéricide du sérum, manifeste dans les deux sérums, s'est montrée cependant plus grande dans le sérum du cobaye neuf que dans celui du vacciné. Le vibrion s'adapte donc facilement à vaincre cette propriété bactéricide, puisqu'il donne des cultures abondantes dans le sérum des deux sortes de cobayes. Ce fait nous empêche d'admettre que la propriété bactéricide fait défaut dans l'exsudat du cobaye vacciné, et qu'elle s'exerce seulement lorsque les vibrions pénètrent dans le sang : pendant leur séjour prolongé dans l'exsudat, ces microbes ont assez de temps pour s'adapter à la vie dans les humeurs du cobaye vacciné.

III

Tandis que nous avons pu constater le fait remarquable découvert par MM. Behring et Nissen, nous n'avons jamais été en état de confirmer l'assertion de M. Pfeiffer sur l'absence complète de phagocytose chez les cobayes vaccinés contre le vibrion. Dans toutes nos expériences, qui ont été multipliées, nous avons vu la phagocytose très prononcée chez des cobayes vaccinés et l'absence de ce phénomène chez des cobayes témoins. Puisque ces faits ont une portée générale très grande, j'ai dû poursuivre leur étude aussi loin que possible.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les leucocytes commencent par être attirés presque aussitôt après l'inoculation des vibrions dans l'organisme des cobayes vaccinés. Dans un exsudat tout récent, dans lequel on ne trouve qu'un petit nombre de leucocytes, on rencontre déjà de ces phagocytes renfermant des microbes en plus ou moins grande quantité. Sur des préparations colorées (Pl. XIII, fig. 2, 8) les

vibrions renfermés dans le corps des leucocytes se colorent fortement, ce qui indique qu'ils ont été englobés à l'état normal. Ce résultat est en parfaite concordance avec la longue survie des vibrions dans l'exsudat des cobayes vaccinés, survie que nous avons déjà signalée. On pourrait donc admettre, en rapprochant ces faits, que les leucocytes englobent des vibrions vivants, qui n'ont point été atteints par le « pouvoir bactéricide » du liquide de l'exsudat. Mais, à cause de l'importance de cette conclusion, qui réfute l'objection si souvent émise contre la théorie des phagocytes (surtout par M. Flügge et son école), il faut la contrôler à l'aide d'un procédé fort simple. On n'a qu'à retirer une goutte de l'exsudat qui se forme au point d'inoculation chez le cobaye vacciné, et à la maintenir pendant quelques heures à une température convenable (30-39°), pour se convaincre que dans cet exemple, comme dans tant d'autres, les microbes ont été réellement englobés vivants. Si on prend l'exsudat dans lequel se trouvent encore des vibrions libres, on constate que ces bactéries se multiplient dans le liquide à tel point que la goutte de l'exsudat devient complètement trouble. Si, au contraire, on retire l'exsudat 14-48 heures après l'inoculation du vibrion sous la peau des cobayes vaccinés, on voit constamment se produire le phénomène suivant. L'exsudat qui vient d'être retiré ne renferme que des leucocytes dont un certain nombre présente des granulations arrondies en quantité plus ou moins grande. Ce n'est que sur des préparations colorées qu'on peut s'assurer que ces granules sont véritablement des vibrions englobés. Mais laissons le même exsudat pendant quelques heures à l'étuve, et nous ne tarderons pas à apercevoir certains leucocytes devenus démesurément grands et renfermant un amas de vibrions. Les leucocytes gonflent beaucoup (fig. 4. 6) et finissent par éclater en un ou plusieurs points de leur périphérie (fig. 5, 7), de sorte que les microbes s'échappent de leur intérieur et forment des amas de vibrions extracellulaires. Ces vibrions continuent leur développement dans le liquide de l'exsudat, qui se présente ainsi comme un bon milieu de culture.

Vu la constance de ces faits et leur constatation facile, on peut recommander cet exemple du *Vibrio M.* pour la démonstration et l'étude de la propriété des phagocytes d'englober et de détruire les microbes vivants.

L'interprétation de ces faits est fort simple. La partie humorale de l'exsudat des cobayes vaccinés, loin d'être bactéricide pour les vibrions, leur permet un développement considérable. Sa partie cellulaire, composée de leucocytes émigrés, est, au contraire, capable de s'opposer à ce développement. Les leucocytes englobent les vibrions et finissent par les tuer dans leur contenu cellulaire. L'examen microscopique de l'exsudat coloré démontre que les vibrions, qui au début se colorent comme à l'état normal, perdent avec le temps cette propriété ainsi que la netteté des contours, et il ne reste bientôt que leurs débris. La fonction bactéricide dans l'organisme vacciné réside donc dans les phagocytes et non dans le liquide qui les baigne. Mais, lorsque l'exsudat est retiré de l'organisme, et soumis à des conditions dans lesquelles les leucocytes s'affaiblissent et meurent, les vibrions encore vivants dans l'intérieur de ces cellules prennent le dessus, et continuent à se développer sans empêchement.

Dans les cas où l'inoculation des vibrions à des cobayes neufs produit une maladie mortelle et de courte durée, les leucocytes ne se trouvent qu'en petite quantité dans l'exsudat. Le très petit nombre de ces cellules qu'on y rencontre ne renferme point de vibrions, de sorte que la phagocytose fait complètement défaut. Cette absence des leucocytes si remarquable ne s'explique point par la théorie qui invoque une action empêchant la dilatation vasculaire, car ni la dilatation des vaisseaux, ni la transsudation consécutive d'un liquide ne font défaut. Tout au contraire. L'hypérémie des parties lésées chez des cobayes vaccinés est même très grande, et l'exsudat liquide très abondant et souvent même hémorragique. L'absence des leucocytes dans cet exsudat s'explique au contraire, sans aucune difficulté, par l'influence chimiotactique négative exercée par la toxine vibrionienne sur les cellules. Cette influence est même si marquée qu'elle peut être constatée après l'injection des cutlures stérilisées riches en toxine et en cadavres de vibrions. L'introduction, dans l'organisme des cobayes, d'une quantité mortelle de ces cultures provoque la tuméfaction de l'endroit inoculé, et la formation d'une exsudation sous-cutanée et péritonéale qui ne renferme point ou ne contient que fort peu de leucocytes. Ce fait nous fournit encore la preuve que l'attraction et la répulsion des leucocytes résultent d'une influence des toxines bactériennes, contrairement à l'opinion de M. Bu-

chner qui attribue l'influence chimiotactique positive à des cadavres de microbes. Dans les cultures stérilisées du vibrion, assurément les cadavres ne manquent pas, et pourtant l'exsudat provoqué par ces cultures ne contient presque pas de leucocytes, tout comme l'exsudat des cobayes non vaccinés, inoculés avec des cultures vivantes. Si ces dernières sont injectées en assez grande quantité, et sont assez virulentes pour donner une mort rapide aux cobayes, l'exsudat ne renferme des leucocytes qu'en nombre tout à fait insignifiant, et se présente comme une culture pure du vibrion dans le liquide. Mais dans les cas où la quantité de culture n'est pas suffisante pour donner la mort, ou lorsque le virus n'est pas assez actif, il se produit chez le cobaye non vacciné une émigration de leucocytes d'abord faible, ensuite très accentuée. Le cobaye guérit en manifestant des phénomènes de phagocytose tout à fait semblables à ceux que nous avons décrits chez les cobayes vaccinés, inoculés avec le vibrion.

IV

Ainsi que nous l'avons déjà dit, le *Vibrio M.* se développe très bien dans l'humeur aqueuse des cobayes vaccinés, et peut être facilement habitué à donner des cultures dans le sang et le sérum de ces cobayes. Mais, tandis que ce microbe se développe dans l'humeur aqueuse tout à fait de la même façon chez les cobayes vaccinés et non vaccinés, son développement dans le sang et le sérum des deux catégories d'animaux présente des différences notables. Dans le sang et le sérum des cobayes non vaccinés, le vibrion se développe comme dans les milieux liquides ordinaires et comme dans l'humeur aqueuse, c'est-à-dire que les individus sont mobiles et pour la plupart isolés les uns des autres. Les microbes se présentent quelquefois sous forme de spirilles allongées, mais ne donnent que rarement des amas épais de vibrions immobiles. Par contre, dans le sang et le sérum des cobayes vaccinés, ce dernier mode de croissance constitue la règle générale. La grande majorité des vibrions est immobile et forme des paquets plus ou moins grands, épars dans le liquide, qui ne renferme que très peu de vibrions isolés.

Cette différence de croissance est analogue à celle qui a été signalée pour la première fois par MM. Charrin et Roger pour le bacille du pus bleu semé dans le sérum des lapins neufs et des lapins vaccinés contre la maladie pyocyanique. Elle se rencontre aussi pour le microbe de la pneumonie, qui forme dans le sérum des lapins vaccinés des paquets de streptocoques très longs.

Ce fait, présentant une importance générale, doit être examiné de plus près. Quelles sont les conditions nécessaires pour la production de ces cultures de vibrions immobiles et réunis en amas épais ?

Si au lieu de nous servir de sang ou de sérum, nous prenons l'exsudat qui se forme au point d'injection d'une culture stérilisée chez des cobayes vaccinés contre le vibrion, nous verrons que ce microbe se développe dans ce liquide d'une façon absolument normale. Ainsi, dans la sérosité formée sous la peau d'un cobaye hypervacciné et accoutumé à des doses considérables de culture stérilisée, le vibrion se développe en forme de « virgules », pour la plupart isolées et mobiles, tout à fait comme dans la sérosité du cobaye non vacciné.

Dans l'exsudat des cobayes vaccinés et inoculés avec un virus vivant, les vibrions se développent de la même façon normale, à condition que cet exsudat renferme encore des vibrions libres non englobés par les leucocytes. Si, au contraire, on retire l'exsudat à une époque plus avancée, lorsque tous les vibrions sont déjà englobés par ces phagocytes, les cultures qui se développent après un séjour dans l'étuve (V. chap. III), sont composées de vibrions presque toujours immobiles et réunis en amas.

C'est donc après avoir subi une influence directe des leucocytes, que les vibrions se développent en amas et restent immobiles dans l'exsudat. Il est possible que, dans le sérum, les vibrions ensemencés soient plus sensibles à l'action des substances provenant des leucocytes et que leur développement anormal soit dû à cette influence. Cette question mérite d'être étudiée dans un travail spécial. Il est probable que les variations morphologiques des bactéries présenteront une grande importance pour révéler des changements très délicats survenus dans les milieux.

V

Quelle est la virulence des vibrions qui ont séjourné dans l'organisme des cobayes vaccinés?

Pour tuer un cobaye, il faut une quantité assez grande de culture : ainsi on injecte 0,5 à 1cc de culture dans du bouillon sous la peau. La goutte d'exsudat que l'on peut retirer du point d'inoculation chez un cobaye vacciné ne suffit pas pour donner la maladie mortelle à un cobaye neuf, d'autant plus que dans cet exsudat, beaucoup de vibrions sont déjà englobés par les leucocytes. Le pigeon prend, par contre, la septicémie vibrionienne avec des doses plus faibles. En inoculant un pigeon avec une goutte de l'exsudat retiré d'un cobaye vacciné, on lui donne la maladie mortelle. Ainsi, dans une expérience, un peu d'exsudat de cobaye vacciné, retiré 44 heures après l'inoculation du virus sous la peau de la cuisse, et inoculé dans le muscle pectoral d'un pigeon, lui donna la mort en 9 h. 1/4. Ordinairement, cette virulence ne se maintient pas aussi longtemps, au moins vis-à-vis du pigeon. Le Bruant (*Emberiza citrinella*) reçoit la septicémie vibrionienne mortelle, même lorsqu'on lui inocule l'exsudat du cobaye vacciné, dans lequel tous les vibrions sont englobés par les leucocytes.

Quoique ces expériences démontrent que les vibrions ont conservé leur virulence dans l'organisme des cobayes vaccinés, il a fallu cependant s'assurer de leur action sur les cobayes. Comme les cultures du vibrion dans le bouillon ne se renforcent pas, qu'elles ont, au contraire, une grande tendance à s'atténuer, et qu'il faut toujours tenir compte de ce fait pour conserver la virulence du microbe, le moyen le plus simple était d'inoculer à des cobayes des cultures du vibrion, puisé dans l'exsudat des cobayes vaccinés. Des recherches variées sur ce sujet ont prouvé que la virulence du vibrion persiste très longtemps dans l'organisme des cobayes rendus réfractaires. Ainsi, par exemple, 0,5cc d'une culture, semée avec une goutte de l'exsudat sous-cutané, retiré 19 heures après l'inoculation du vibrion sous la peau de la cuisse d'un cobaye vacciné, donna la mort à un cobaye de 575 grammes en 16 heures et 15 minutes. Ce résultat est d'autant plus remarquable que le virus originel (inoculé au cobaye

vacciné) n'a tué le cobaye témoin (de moyenne grosseur) qu'en 23 heures. Dans d'autres expériences, le virus s'est montré encore plus actif. L'exsudat de l'œil des cobayes vaccinés fournit des cultures dans du bouillon possédant la plus grande virulence. Même après 5 et 7 jours de séjour dans l'œil du cobaye vacciné, l'exsudat a donné des cultures qui ont tué les cobayes en 6 h. 1/2 et en 7 h. 1/2, avec des lésions indiquant le processus morbide le plus aigu (absence d'œdème cutané et exsudation péritonéale). Dans ces expériences, le virus originel était d'une virulence moyenne et tuait les cobayes en 20 heures environ.

Le virus introduit dans l'organisme réfractaire, au lieu de s'atténuer brusquement, subit, au contraire, un renforcement notable, comme cela a déjà été constaté pour d'autres microbes pathogènes. Je ne veux cependant pas nier que l'atténuation ne puisse se faire dans ces conditions car dans une expérience relatée par M. Pfeiffer (*l. c.*, p. 360), après 90 heures de séjour sous la peau d'un cobaye vacciné, le vibrion a donné des cultures qui ne tuaient plus que des pigeons et la moitié des cobayes inoculés. Il se pourrait bien que les vibrions, avant de mourir dans les leucocytes, présentent dans les derniers moments une véritable atténuation de la virulence. Cette expérience nous démontre aussi que l'atténuation persiste alors dans les cultures du vibrion retiré de l'organisme.

Le vibrion, cultivé dans l'humeur aqueuse des cobayes vaccinés, conserve sa virulence originelle. Celui qui a été cultivé dans le sang ou le sérum des cobayes vaccinés s'est montré virulent pour le cobaye trois fois sur quatre expériences. Cette exception ne renverse pas la règle établie plus haut, parce qu'en injectant à des cobayes des cultures d'une bactérie dans le sang ou le sérum, nous introduisons ces humeurs, qui elles-mêmes, exercent une influence marquée dans l'organisme inoculé. Ainsi, d'après MM. Massart et Bordet[1], le sérum des lapins vaccinés contre la maladie pyocyanique attire les leucocytes d'autres lapins en raison de sa propriété chimiotactique.

S'il n'est pas possible d'admettre une atténuation de la virulence des vibrions séjournant dans l'organisme des cobayes vaccinés, peut-être pourrait-on accepter une propriété toxinicide

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, juillet, p. 434.

des humeurs de ces cobayes, propriété analogue à celle qui a été découverte par MM. Behring et Kitasato [1] chez les animaux vaccinés contre le tétanos, et par M. Ehrlich [2] chez les animaux vaccinés contre les toxines végétales — ricine et abrine. Or, justement, la maladie vibrionienne des cobayes peut servir d'exemple d'une infection toxique, dans laquelle la toxine bactérienne n'est point détruite dans le corps des animaux vaccinés. Comme l'ont déjà montré MM. Gamaleïa [3] et Pfeiffer [4], les cobayes complètement vaccinés contre le vibrion vivant, sont aussi sensibles aux toxines que les cobayes non vaccinés. Pour tuer les animaux de ces deux catégories, il faut la même dose d'une culture stérilisée du vibrion. Si, dans le cobaye vacciné, au moins une partie de la toxine était détruite par une propriété toxinicide des humeurs, il faudrait pour tuer un cobaye une quantité un peu plus grande de la culture stérilisée que pour le cobaye témoin. Mes propres expériences ont confirmé les données des auteurs cités sur l'égalité de la dose mortelle pour les cobayes vaccinés et non vaccinés.

La constance des lésions morbides qui apparaissent chez les cobayes vaccinés et même hypervaccinés, après l'introduction des cultures vivantes, et aussi des cultures stérilisées du vibrion dans leur corps, démontre l'action de la toxine vibrionienne. Nous avons déjà vu que l'inoculation du vibrion dans l'œil des cobayes vaccinés provoque une ophtalmie et une conjonctivite très graves. Ces troubles sont occasionnés par la toxine, ainsi que l'œdème cutané, la fièvre et autres phénomènes morbides qu'on observe chez les cobayes vaccinés.

VI

En résumant tout ce qui a été établi au sujet de l'immunité acquise des cobayes vis-à-vis du *Vibrio Metchnikowii*, on arrive à la conclusion que la théorie humorale de l'immunité est incapable de rendre compte des phénomènes observés sur l'animal

1. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1890, N. 49, p. 1113.
2. *Ibid.*, 1891, N. 32.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889, p. 543.
4. Behring, *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XI, 1890, p. 474.

vivant. Cet exemple, qui paraissait fournir la preuve la plus évidente en faveur de la théorie de l'immunité, basée sur la propriété bactéricide des humeurs, présente, au contraire, l'objection la plus sérieuse contre cette manière de voir. Malgré l'existence du pouvoir bactéricide le plus manifeste *in vitro*, cette propriété ne s'exerce point dans l'organisme vacciné.

Par contre, ce même exemple du vibrion chez les cobayes vaccinés, qui nous apparaissait comme l'objection la plus grave ou au moins comme une exception importante à la règle établie par la théorie des phagocytes, se transforme, après une analyse des faits, en une confirmation de cette théorie. Nous voyons ici un cas où le microbe introduit dans l'organisme vacciné provoque, à l'aide de sa toxine, des lésions marquées, accompagnées d'une exsudation inflammatoire, et de l'arrivée d'un grand nombre de leucocytes sur le champ de bataille. Ces cellules, à l'aide de leurs propriétés phagocytaires, englobent les microbes vivants et virulents jusqu'à ce qu'il n'en reste point de libres. Les vibrions, capables de se multiplier dans la partie liquide de l'exsudat, ne se développent pas dans l'intérieur des phagocytes, mais y conservent encore pendant longtemps leur vitalité. Ces cellules cependant finissent par détruire tous les vibrions englobés, débarrassant ainsi, d'une façon définitive, l'organisme de ses envahisseurs.

EXPLICATION DES FIGURES.

Fig. 1. — Vibrions dans l'exsudat sous-cutané d'un cobaye sensible,

Fig. 2. — Vibrions libres et renfermés dans les leucocytes d'un cobaye vacciné. Exsudat retiré quatre heures après l'inoculation.

Fig. 3. — Un leucocyte rempli de vibrions et englobé par un macrophage.

Fig. 4. — Un leucocyte gonflé à la suite du développement des vibrions dans son contenu.

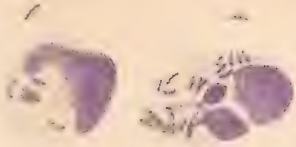
Fig. 5. — Le même leucocyte quelques heures plus tard. Les vibrions se sont débarrassés en partie.

Fig. 6. — Trois leucocytes d'un exsudat maintenu à l'étuve. L'un d'eux est rempli de vibrions.

Fig. 7. — Les mêmes leucocytes une heure et cinquante minutes plus tard. Le leucocyte renfermant des vibrions a éclaté à plusieurs endroits.

Fig. 8. — Un leucocyte mort dans l'exsudat maintenu à l'étuve et renfermant des vibrions vivants.

Annales de l'Institut Pasteur.



V. Roussel, lith.

Imp. A. Lahure, Paris.

SUR LA PROPRIÉTÉ BACTÉRICIDE DU SANG DE RAT

PAR MM. E. METCHNIKOFF ET E. ROUX.

I

L'étude du charbon des rats a pris, dans ces dernières années, une importance considérable. Les auteurs qui ont fait des recherches sur ce sujet ont suivi deux voies différentes ; les uns, comme M. Behring [1], ont concentré leur attention sur les propriétés du sang et du sérum en dehors de l'organisme, tandis que les autres ont fait leurs observations sur l'animal vivant. Ces deux modes d'investigation ont conduit à des résultats opposés, qui, jusqu'à présent, n'ont point été conciliés.

M. Behring a constaté que le sang des rats empêche le développement de la bactéridie en dehors de l'organisme, et il pense que cette propriété est la cause de l'immunité de cette espèce animale pour le charbon. Car, d'après cet auteur, le rat serait un animal réfractaire à la maladie charbonneuse.

D'autres observateurs, comme M. Frank, tout en admettant l'immunité du rat blanc vis-à-vis de la bactéridie, nient l'influence du sérum acceptée par M. Behring, et constatent que le bacille charbonneux peut germer et croître dans l'organisme des rats.

L'un de nous [2], en examinant surtout les phénomènes qui se passent chez le rat vivant, croit avoir fourni toute une série de preuves qui contredisent la manière de voir de M. Behring.

Sans entrer dans l'analyse de ces objections, M. Behring [3], dans plusieurs publications récentes, maintient son opinion sur

1. *Centralblatt für klinische Medicin*, 1888, n° 38.
2. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1890, p. 193.
3. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. IX, 1890, p. 465.

le rôle que joue la propriété bactéricide du sang et du sérum des rats dans l'immunité de ces rongeurs.

Des expériences nouvelles de MM. Ogata et Jasuhara [1] et de M. Hankin [2], sont venues à l'appui de cette manière de voir.

Dans le but d'éclaircir les contradictions qui se sont accumulées sur cette question du charbon des rats, nous avons entrepris quelques expériences dont nous allons exposer les principaux résultats.

II

Lorsque l'on sème la bactéridie filamenteuse ou à l'état de spores dans le sérum de rat, on obtient quelquefois des cultures, même abondantes. Dans d'autres cas, les bactéridies ne germent pas et ne donnent aucun développement.

L'action de ce sérum des rats est encore bien plus remarquable quand on l'injecte mélangé à des spores charbonneuses sous la peau de souris ou d'autres rats.

MM. Ogata et Jasuhara, ainsi que M. Behring, ont constaté que dans ces conditons les souris ne prennent pas le charbon. M. Hankin a vu qu'un mélange de sérum de rat et de spores charbonneuses très virulentes ne donne pas le charbon aux souris.

Dans nos expériences, la maladie ne s'est pas développée quand nous avons inoculé les bactéridies filamenteuses, mélangées avec le sang ou le sérum de rats blancs ou de rats d'égout. Lorsque ces humeurs étaient additionnées de spores charbonneuses, la maladie et la mort survenaient, mais tardivement. Les spores injectées en suspension dans l'eau (sans addition de sérum) ont tué 8 souris témoins dans un temps qui a varié de 20 à 44 heures [3] ; les mêmes spores, mélangées au sérum de rat ont donné la mort à 18 souris en un laps de temps de 27 heures à 9 jours [4].

Cet arrêt ou ce retard de la maladie peut être produit avec

1. *Centralblatt für Bacteriologie*, 1891, n° 1.
2. *Ibid.*, 1891, p. 336.
3. Voici le temps de la mort de ces souris témoins : 20, 23, 24, 24, 27, 30, 30, 44 heures.
4. Voici le temps de la mort des souris d'expérience : 27, 27, 45, 48, 50, 50, 54, 74, 84, 86, 86, 90, 116 heures ; 5, 6, 7, 8, 9 jours.

des doses très variées du sérum ou de sang. Quelques gouttes produisent l'effet aussi bien que 0,25 et 0,5^{cc}.

Mais, pour que le charbon soit ainsi entravé, il faut qu'il y ait contact immédiat des bactéridies ou de leurs spores avec les humeurs extraites du rat. Lorsqu'on introduit séparément la bactéridie et le sérum, alors même que les injections sont faites dans des points très voisins l'un de l'autre, l'effet préservateur est nul. Ainsi, une souris qui a reçu sous la peau de la cuisse huit gouttes de sérum de rat, et tout à côté une goutte d'une culture de bactéridie asporogène dans du bouillon, est morte en moins de vingt-quatre heures, trois quarts d'heure seulement après la souris témoin (inoculée avec la même culture sans sérum).

III

Il est incontestable que le sang et le sérum du rat empêchent ou retardent le développement du charbon chez la souris : il faut se demander si ce phénomène est dû à l'immunité naturelle des rats contre cette maladie. M. Behring n'hésite point à répondre affirmativement à cette question. Pour lui, le rat est un animal réfractaire au charbon, et il est réfractaire grâce à la propriété bactéricide de son sérum, qui s'exerce non seulement dans l'organisme du rat ou *in vitro*, mais aussi dans le corps d'un animal aussi sensible à la bactéridie que la souris.

Nos recherches ne confirment pas cette manière de voir. Les rats avec lesquels nous avons expérimenté se sont montrés aussi peu réfractaires au charbon que ceux qui ont été étudiés par MM. Lœffler, Straus, Metchnikoff et Savtchenko.

Sur 17 rats inoculés avec des doses faibles ou moyennes, 2 seulement ont survécu, tandis que 15 autres sont morts du charbon dans un délai de 43 heures à 32 jours après l'inoculation.

Voici le résumé de ces expériences :

Nos	Temps de la mort.	Poids du cadavre.
1	6 jours.	182 grammes.
2	5 jours.	105 —
3	15 jours.	
4	43 heures.	160 —
5	23 jours.	129 —
6	60 heures.	154 —
7	65 heures.	145 —
8	5 jours.	108 —
9	18 jours.	141 —
10	60 heures.	125 —
11	5 jours.	86 —
12	4 jours.	156 —
13	75 heures.	113 —
14	4 jours.	130 —
15	32 jours.	167 —
16	Survie de 1 mois.	
17	Survie de 1 mois.	

Le rat mort le plus rapidement (en 43 heures) a reçu dans la veine jugulaire 0,3cc d'eau stérilisée tenant en suspension des spores charbonneuses.

Ce n'est donc que dans des cas exceptionnels que les rats survivent même à la première inoculation, et pourtant leur sang et leur sérum exercent une influence prophylactique très marquée. Ce résultat, qui ressort des données que nous avons déjà communiquées, a été confirmé par des expériences spéciales.

Une goutte d'une culture récente de bactéridie asporogène dans du bouillon est mélangée avec huit gouttes de sérum de rat blanc : le tout est injecté sous la peau du dos d'une souris ; 0,25cc de la même culture sont inoculés sous la peau du dos d'un rat blanc.

Tandis que le rat mourait, 5 jours après l'inoculation, avec tous les signes caractéristiques du charbon (œdème, rate hypertrophiée, bactéridies dans la rate et le sang), la souris restait bien portante.

Dans une autre expérience l'action prophylactique a été exercée par le sang d'un rat qui s'est montré très sensible au charbon.

Un peu de sang de cobaye mort du charbon asporogène a été introduit dans la jugulaire d'un rat blanc. 0, 25cc du sang de ce rat, mélangés avec un peu de sang du même cobaye, ont été inoculés sous la peau du dos d'une souris blanche. Tandis que le rat (dont le cadavre pesait 125 grammes), mourait

du charbon en 60 heures, la souris (dont le cadavre pesait 17 grammes), ne succomba au charbon que 24 heures plus tard, c'est-à-dire en 84 heures.

Bien que, dans ce cas, la souris ait fini par mourir, cependant elle a succombé avec un retard très sensible, grâce à l'intervention du sang de rat.

Cette action prophylactique du sang et du sérum des rats s'exerce non seulement dans l'organisme de la souris, mais aussi dans celui des rats.

Dans nos expériences, les rats qui ont été inoculés avec la bactéridie seule se sont montrés sensibles au charbon; au contraire, ceux qui ont reçu la bactéridie mêlée au sérum d'autres rats ont tous survécu. Ils ont résisté alors même qu'on leur a injecté des spores en suspension dans le sérum. Chez eux on n'a même pas constaté l'œdème qui s'observe chaque fois que l'on inocule le charbon pur sous la peau des rats, soit qu'ils résistent, soit qu'ils meurent.

On peut encore démontrer cette influence prophylactique que le sérum de rat exerce dans l'organisme d'un autre rat inoculé en procédant de la façon suivante. On injecte d'un côté, sous la peau, quelques gouttes d'eau tenant en suspension des spores charbonneuses, et, de l'autre côté, les mêmes spores mélangées avec du sérum d'un autre rat. Ce sérum empêche le développement du charbon au point où il a été inoculé, mais n'exerce aucune influence sur le côté opposé, où il se développe un œdème charbonneux suivi de la généralisation de la bactéridie et de la mort de l'animal.

Pour retirer du sang ou du sérum prophylactique, il n'est pas besoin d'avoir de vieux rats qui sont, en général, moins sensibles au charbon. Des rats de moyenne taille ou même de jeunes rats fournissent également un sérum qui protège les rats et les souris contre la bactéridie charbonneuse. Ce résultat concorde parfaitement avec les expériences que M. Hankin a communiquées au Congrès d'hygiène de Londres. Le sérum d'un rat âgé d'un mois a fourni un sérum prophylactique, et cependant ce rat devait être très sensible à la bactéridie puisque ses frères de la même portée, pris comme témoins, ont tous succombé au charbon. M. Hankin conclut de cette expérience que la substance bactéricide du sérum ne se trouve point préformée dans le plasma sanguin.

L'ensemble des faits que nous venons de rapporter démontre que la propriété bactéricide du sang et du sérum de rats n'est point en rapport avec la prétendue immunité de ces animaux.

Les spores de la bactéridie, inoculées à des rats, germent régulièrement au bout de peu de temps, même chez ceux qui résistent à l'infection. Trois heures après l'inoculation sous-cutanée, on trouve déjà des bacilles, composés de plusieurs segments. La bactéridie germe, se développe, sécrète ses toxines, qui produisent un œdème considérable, en un mot le rat tombe malade et meurt le plus souvent. La guérison est l'exception. Dans les tubes de sérum, ou dans les gouttes suspendues de sérum de rat, les spores charbonneuses germent quelquefois, quoique tardivement; d'autres fois elles ne donnent point de cultures même au bout de plusieurs jours.

Il y a donc, sous tous les rapports, une différence notable entre la manière dont se comporte la bactéridie dans le sang et le sérum extraits de l'organisme et dans le corps de l'animal vivant.

La preuve que l'action prophylactique du sérum de rat n'est pas due à l'immunité de cet animal est fournie non seulement par le fait de la réceptivité du rat pour le charbon, mais encore par l'absence de l'action prophylactique de la part du sang et du sérum d'animaux vraiment réfractaires. L'assertion de MM. Ogata et Jasuhara sur la préservation des souris contre le charbon, au moyen du sang et du sérum de la grenouille et du chien, n'a pas été confirmée.

Pour ce qui concerne le chien, M. Enderlen[1] a déjà combattu les données des auteurs japonais. Nos propres recherches et celles de M. Peterman (v. p. 506), sur l'action qu'exerce le sérum de chien chez les souris inoculées du charbon ont donné des résultats tout à fait opposés à ceux de MM. Ogata et Jasuhara. M. Roudenko (v. plus loin, p. 515), répétant les expériences de ces auteurs en ce qui concerne le sang et le sérum de la grenouille, est également arrivé à rejeter les conclusions des savants japonais.

Tandis que le rôle prophylactique du sang et du sérum des rats est très manifeste, il n'en est point ainsi pour la rate. Les souris prennent le charbon lorsqu'on les inocule avec des bacté-

1. *Münchener med. Woch.*, 1891, p. 320.

ridies ou des spores mélangées au liquide obtenu en broyant rapidement avec un peu d'eau la rate extraite du corps de rats blancs ou de rats d'égout.

Ces expériences nous ayant donné toujours le même résultat, nous ne les avons pas poursuivies davantage.

IV

Après nous être assuré du pouvoir prophylactique du sérum des rats, nous avons voulu nous faire une idée plus précise du mécanisme de son action dans l'organisme des souris et des rats.

Dans ce but, nous avons inoculé sous la peau de ces animaux des spores charbonneuses mélangées avec le sérum des rats, et nous avons retiré l'exsudat sous-cutané après des temps différents. En faisant la comparaison avec ce qui se passe chez des animaux témoins, inoculés avec des spores sans sérum, nous avons pu constater des différences notables.

Chez les souris et les rats inoculés avec des spores sous la peau, la germination se fait dès les premières heures; au contraire, chez les animaux inoculés avec les spores et le sérum, ce phénomène était évidemment entravé, tout à fait comme dans les expériences *in vitro*. Mais, après l'injection du sérum avec ou sans spores, il se produit une accumulation de leucocytes à l'endroit lésé.

Cette action chimiotactique positive du sérum des rats sur les leucocytes est facile à constater lorsqu'on introduit, sous la peau des souris, des tubes capillaires pleins de sérum et ouverts à une de leurs extrémités. Ces tubes retirés après quelques heures contiennent un grand nombre de leucocytes qui forment bouchon près de l'orifice.

Grâce à ce retard dans la germination et à l'attraction des leucocytes par le sérum, il se fait bientôt une phagocytose très prononcée.

Déjà deux et trois heures après l'inoculation du mélange de spores et de sérum, on trouve des leucocytes renfermant des spores non germées. Plus tard le nombre des leucocytes augmente, et toutes les spores deviennent leur proie. On rencontre alors des leucocytes dont le contenu est rempli de spores charbonneuses.

Une fois englobées, les spores trouvent des conditions peu favorables pour leur germination, de sorte que les souris restent bien portantes. Mais au bout d'un temps plus ou moins long, souvent après quelques jours, on voit apparaître des bâtonnets au point d'inoculation : leur nombre devient de plus en plus grand et ils finissent par tuer l'animal. Il est très probable que ces bacilles proviennent de spores redevenues libres à la suite de la rupture de quelques leucocytes. Ces spores, se trouvant dans un milieu autre que le sérum injecté, germent alors facilement, et donnent des bacilles qui se défendent contre les leucocytes par les toxines produites. Chez le rat, qui est moins sensible, les spores et les bacilles peu nombreux sont impuissants à donner la maladie grave ou mortelle.

Si, au lieu de spores, on inocule à des souris des bacilles asporogènes mélangés à du sérum de rat, ceux-ci sont d'abord gênés et détruits en partie par le sérum avec lequel ils se trouvent en contact. Ensuite les leucocytes immigrés englobent les bacilles morts et ceux qui ont résisté à l'action du sérum. La bactéridie filamenteuse est digérée dans les cellules, et les souris sont débarrassées définitivement du microbe.

Mais, pour que ces résultats se manifestent, il faut le contact immédiat des bactéridies ou de leurs spores avec le sérum de rat. Si on injecte le microbe et le sérum séparément, le charbon éclate sans entrave.

Il ne s'agit donc pas dans ces expériencees d'une immunité véritable conférée par le sérum de rat, mais d'un phénomène tout local.

Nous conclurons de ce qui précède que le pouvoir bactéricide du sérum des rats, très manifeste *in vitro*, ne peut donner l'explication de l'immunité relative de quelques-uns de ces animaux contre le charbon. L'action préventive que ce sérum exerce, quand il est injecté aux souris en même temps que le virus charbonneux, n'est pas due à une immunisation de la souris, mais à l'influence directe du sérum sur la bactéridie et aussi à son pouvoir chimiotactique sur les leucocytes. Dans ce cas, comme dans tous ceux étudiés jusqu'ici, les phénomènes phagocytaires jouent un rôle important.

ÉTUDE SUR LES SUBSTANCES MICROBICIDES DU SÉRUM

ET DES

ORGANES D'ANIMAUX A SANG CHAUD

PAR M. J. DE CHRISTMAS

(Travail du laboratoire de chimie biologique à l'Institut Pasteur).

Tout organisme vivant possède une résistance naturelle contre l'invasion des germes morbides qui l'entourent. Cette résistance est très relative, et dépend non seulement de l'espèce de micro-organisme en jeu, mais aussi de l'état du protoplasme dans ses différentes formes. Telles cellules, tel liquide de l'organisme forment un milieu nutritif relativement bon ; tel autre s'oppose absolument à tout développement du germe qui y pénètre.

Les causes de cette résistance nous échappent en grande partie. Les matériaux de l'organisme forment-ils un milieu de culture peu avantageux pour le développement des germes, et difficilement assimilable, ou ces matériaux contiennent-ils des substances directement nuisibles pour les microbes ? En d'autres termes, les microbes meurent-ils dans l'organisme parce qu'ils ne peuvent pas y vivre, ou y meurent-ils parce que l'organisme contient des substances qui les tuent ? La distinction paraît subtile, puisque le résultat est le même, à savoir la mort des microbes, mais la différence entre ces deux explications du mécanisme de l'immunité naturelle est fondamentale au point de vue théorique, et nous verrons plus loin qu'on ne s'en est pas toujours rendu compte dans la discussion sur les facultés microbicides des humeurs de l'organisme.

Quel rôle l'élément liquide du sang joue-t-il dans cette résis-

tance naturelle [1] des animaux contre les germes morbides? La question a été très différemment résolue, car tandis que l'opinion générale tient le sang pour un liquide des plus facilement altérables et des mieux appropriés à la culture de toute espèce de microbes, des recherches récentes semblent prouver que tel n'est pas le cas, et que le sang, ou plutôt le sérum, car ces recherches se sont presque toutes restreintes au sérum, loin d'être un milieu nutritif excellent, a une influence souvent funeste sur la vie des germes, qu'il tue ou gêne plus ou moins dans leur développement.

Quelque hasardeux qu'il soit de conclure à ce qui se passe dans le milieu sanguin, en partant d'expériences faites en dehors de l'organisme avec le sérum, même à l'état frais, on a pourtant cherché dans ces expériences la preuve du rôle considérable du sang dans le mécanisme de l'immunité naturelle.

Il y a longtemps qu'on s'occupe de la question, car déjà, en 1874, Traube et Gscheidlen [2] ont démontré qu'on peut introduire des quantités considérables de microbes de la putréfaction dans le sang sans que les animaux en souffrent. Bien mieux, le sang pris avec des précautions antiseptiques, vingt-quatre heures après une telle injection, ne s'altéra pas, ce qui prouve, selon ces savants, que les germes y ont bien été tués.

Fodor [3] arriva au même résultat, et il observa [4] que les bacilles du charbon meurent en grande partie dans le sang extravasculaire.

Les expériences de Nuttall [5], Nissen [6], Behring [7] sont connues des lecteurs de ces Annales, par les revues critiques de Duclaux [8] et Metchnikoff [9]. Je n'ai donc pas besoin de m'y arrêter longtemps. Il me suffit d'indiquer que ce sont surtout les expériences

1. Il est bien entendu que nous ne nous occupons ici que du sang d'animaux *normaux*, c'est-à-dire d'animaux n'ayant subi aucune immunisation artificielle.

2. Ueber Faülniss, *Schlesische Gesellschaft f. vaterl. Cultur*. Section de médecine, 1874.

3. *Archiv. f. Hygiene*, Bd. IV, 1884.

4. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1887.

5. *Zeitschr. f. Hygiene*, vol. IV, 1888.

6. *Ibid.*, vol. VI, 1889.

7. *Ibid.*, vol. VI, 1889, p. 117, et avec Nissen, *ibid.*, vol. VIII, 1890.

8. Sur les théories de l'immunité : ces *Annales*, vol. II, p. 494, et vol. III, p. 491.

9. Sur la propriété bactéricide des humeurs. *Ibid.*, vol. III, p. 664.

de Buchner et de ses collaborateurs qui paraissent démontrer que le sérum frais possède la faculté de tuer très promptement les germes de différents microbes, qu'on y introduit. Pourtant tous les germes n'y meurent pas; il y en a qui résistent et qui ne tardent pas à se développer quelques heures après l'ensemencement. La résistance est donc loin d'être absolue, mais elle existe incontestablement. Elle disparaît après chauffage du sérum à 55° pendant une heure. Buchner a essayé d'expliquer la mort des germes en supposant qu'elle est due à un état particulier des substances albumineuses du sang. Si on dialyse le sérum dans de l'eau distillée, cette faculté disparaît, parce que les sels du sérum se dissolvent dans l'eau. Pourtant les sels eux-mêmes ne possèdent pas cette faculté, mais leur présence est nécessaire pour que les substances albumineuses puissent exercer leur influence.

Behring et Nissen, qui ont repris les expériences de Buchner, n'ont pas obtenu de résultats aussi concluants. Ils ont vu que la bactéridie charbonneuse se développe abondamment dans le sérum de différents animaux à sang chaud, entre autres dans le sérum du lapin normal et rendu réfractaire. Le sérum du rat fait seul une exception, car quelquefois le développement y est très médiocre ou nul. Il est vrai qu'il n'en est pas toujours ainsi, et que le développement s'y fait parfois avec la même abondance que dans le sérum d'autres animaux [1].

Fokker [2] a observé une influence microbicide du lait frais sur deux microbes, un micrococcus et un bacille, isolés du lait. Il trouve qu'une partie des germes introduits dans le lait frais y meurt assez vite, tandis que ceux qui ont résisté recommencent à pulluler après un délai de vingt-quatre heures.

Lubarsch qui, dans un premier travail [3], n'attache aucune importance à cette faculté microbicide du sérum, qu'il considère

1. Dans un récent travail (Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und — methoden. *Zeitschr. f. Hygiene*, vol. IX, 1890), Behring dit avoir obtenu des résultats plus nets avec des rats tout à fait réfractaires au charbon. Non seulement ce sérum s'oppose à tout développement, mais même mélangé avec du sérum d'animaux non réfractaires (le mouton), il continue à empêcher le développement des germes, qu'on y a semés.

2. Ueber bacterienvernichtende Eigenschaften der Milch, *Zeitschr. f. Hygiene*, vol. IX, 1890.

3. *Fortschr. d. Medicin.*, vol. VIII, 1890.

comme à peine prouvée, a repris la question dernièrement [1], en comparant la faculté microbicide avant et après l'infection charbonneuse sur le lapin. Son procédé consiste à saigner le lapin avant et après l'infection, et à fixer par des chiffres le pouvoir microbicide du sérum. Malheureusement il ne nous dit pas quelle quantité de sang il retire chaque fois. Pour peu que les saignées soient abondantes, la densité du sérum change fortement, et les chiffres trouvés ne sont plus comparables, car la différence de densité joue un rôle important dans ces expériences, comme nous allons le montrer tout à l'heure. Même objection pour ses expériences avec les moutons. Il dit lui-même qu'à la dernière saignée la carotide ne contenait plus beaucoup de sang, et il est évident que l'animal, qui mourut le lendemain, est mort d'anémie.

On voit par ce court exposé que tous les auteurs sont d'accord sur ce point important, à savoir que le sérum de différentes espèces d'animaux possède un pouvoir microbicide plus ou moins marqué. A quoi est-il dû, ce pouvoir, et joue-t-il un rôle dans l'immunité naturelle? Pour ce qui concerne la première question, les auteurs sont à peu près tous muets. Excepté Buchner, dont l'explication ne me paraît rien expliquer du tout, on ne s'est pour ainsi dire pas prononcé.

Ces phénomènes expliquent-ils le mécanisme de l'immunité naturelle? Certes non, car l'influence microbicide existe tout aussi bien dans le sérum d'animaux réfractaires que dans ceux qui ne le sont pas. C'est ainsi que les bacilles du choléra et de la fièvre typhoïde sont très vite tués, et pourtant ces deux maladies ne sont pas transmissibles aux animaux. Le bacille du charbon meurt en nombre considérable dans le sang du lapin, animal très peu résistant à cette maladie, tandis que le sérum du cheval, animal bien plus réfractaire, ne paraît tuer la bactéridie qu'en petit nombre. L'immunité naturelle ne trouve donc pas son explication dans ces phénomènes, qui, selon nous, sont d'un ordre purement physique ou physico-chimique, et nullement de nature biologique.

Avant de relater les expériences qui nous paraissent appuyer

1. Untersuchungen üb. die Ursachen d. angeborenen und erworbenen Immunitat, Berlin, 1891.

cette opinion, examinons d'abord les méthodes qu'on a employées pour mettre en évidence cette influence microbicide du sérum : de leur précision dépendra le degré de confiance que nous pouvons avoir dans leurs résultats. Si cette influence était suffisante pour empêcher les microbes de pulluler dans le sérum, rien ne serait plus simple. On n'aurait qu'à ensemencer les tubes contenant le sérum, à les laisser à une température convenable, et à observer si la culture s'y produit ou non ; mais les phénomènes sont malheureusement plus compliqués. Comme nous l'avons vu plus haut, le pouvoir bactéricide n'est qu'une faculté très passagère. Le sérum la perd après quelques jours, et ne la possède même pas d'une façon complète sitôt après la prise du sang, car il n'y a qu'une petite quantité des microbes qui y meurent; les survivants commencent après un temps plus ou moins long (de 1 à 4 heures) à peupler le sérum comme si celui-ci était un excellent milieu nutritif.

On voit donc qu'il s'agit ici d'observations très délicates, observations qu'on n'aurait probablement jamais faites sans la méthode dite des plaques, dont le principe, comme on le sait, est de mélanger à du sérum une petite quantité de culture du microbe à étudier, d'introduire, aussitôt le mélange fait, une goutte de ce sérum dans de la gélatine qu'on répand sur une plaque, et de recommencer cette même opération à divers intervalles, dont chacun mesure la durée du contact du sérum et du microbe expérimenté. Chacune de ces plaques fournit un certain nombre de colonies : la première est la plaque de contrôle, et les différences entre le nombre des colonies qu'elle porte et celui des plaques suivantes indiquent la puissance microbicide du sérum. Ces différences sont quelquefois très considérables, par exemple dans les expériences de Buchner avec le bacille de la fièvre typhoïde dans le sérum du lapin, ou dans les expériences de Behring avec le charbon dans le sérum du rat. D'autres fois la différence est insignifiante et dans les limites des causes d'erreur que comporte la méthode, qui, il faut en convenir, est loin d'avoir la précision mathématique dont elle semble douée. D'abord la répartition des germes dans le sérum ne peut être uniforme, à cause de l'enveloppe gélatineuse qui entoure le corps des microbes et qui s'oppose à leur séparation. Ensuite les volumes de sérum mélangés avec la gélatine ne sont jamais

absolument égaux. La quantité employée est ordinairement la gouttelette adhérente à une petite anse de platine, mais cette mesure n'a rien de très exact, et quand même les différences ne seraient pas grandes, elles suffisent pour rendre illusoire l'exactitude que les chiffres ont la prétention de représenter. Car dans un milieu où chaque goutte peut contenir plusieurs milliers d'individus, on comprend que la moindre variation de volume doit changer le résultat.

Un autre point faible de la méthode est l'intervention des différences de densité, et plus généralement de composition, entre le liquide de culture et le liquide d'essai. Metchnikoff [1] a déjà attiré l'attention sur ce point, qui en effet peut suffire pour expliquer la mort des germes. Car les constitutions chimique et physique du sérum et du bouillon nutritif sont tellement différentes, qu'il doit nécessairement en résulter une influence fâcheuse pour les microbes, dont nous connaissons depuis longtemps le besoin d'adaptation graduelle pour pouvoir pousser vigoureusement dans un nouveau milieu. Or le transport du bouillon dans le sérum se fait brusquement, et doit sans doute provoquer la mort de beaucoup d'individus qui, pour une raison ou une autre, sont trop affaiblis pour s'adapter au nouveau milieu.

Les expériences de Hafkine [2] sur l'influence du changement brusque du milieu sur le bacille de la fièvre typhoïde mettent bien en évidence ce phénomène. M. Hafkine a justement choisi le bacille de la fièvre typhoïde, celui qui, avec le bacille du choléra, a surtout été employé dans les expériences rappelées plus haut, et il a trouvé que ce microbe, introduit brusquement dans l'humeur aqueuse du mouton, y meurt, tandis que, si on l'habitue graduellement à vivre dans ce milieu, non seulement il y vit, mais il s'y développe plus vigoureusement que dans le bouillon.

J'ai cherché jusqu'à quel point le bacille du charbon, pourtant bien moins sensible aux changements de milieux que le bacille de la fièvre typhoïde, était influencé par des milieux de densité différente, et je trouve que cette influence, tout en n'étant pas aussi marquée que sur les microbes mentionnés plus haut, existe pourtant et joue un rôle qui ne doit pas être négligé.

1. *Loc. cit.*
2. Recherches sur l'adaptation au milieu chez les infusoires et les bactéries. *Annales de l'Institut Pasteur*, vol. IV, 1890.

L'expérience a été faite de la manière suivante. Une culture de charbon sur de la gélose fut ensemencée dans du sérum de bœuf stérilisé, et placée dans l'étuve à 37°. Toutes les 24 heures, pendant les dix jours suivants, on ensemençait un nouveau tube de sérum, en employant toujours la culture du jour précédent, afin de bien habituer le charbon à pousser dans le sérum. Au dixième jour l'essai suivant fut fait. Une goutte de la dixième génération dans le sérum fut introduite dans cinq centimètres cubes de bouillon de bœuf faiblement alcalin. Tout de suite après l'agitation, une petite quantité (la contenance d'une anse de platine) fut mélangée à cinq centimètres cubes de gélatine nutritive et répandue sur une plaque. Une demi-heure après, une quantité égale de bouillon fut de nouveau ensemencée dans de la gélatine et répandue sur une nouvelle plaque. 2 heures après, renouvellement de la même expérience. Le bouillon fut alors placé pendant 12 heures à une température assez basse pour empêcher les germes, qui s'y trouvaient, de se multiplier, et un nouvel ensemencement fut fait toujours avec la même quantité de bouillon. Les plaques furent placées pendant 36 heures à 24° pour permettre aux germes survivants dans la gélatine de former des colonies.

Or, voici le nombre des colonies qui, dans deux expériences, avaient poussé sur les quatre plaques :

NOMBRE DES COLONIES

		Plaques		
	Plaque de contrôle.	1 heure après.	2 heures.	12 heures.
I.....	120	56	48	27
II.....	741	369	315	107

On voit donc que le nombre des colonies avait diminué de près de moitié, déjà une heure après, et continuait ensuite à décroître. Et pourtant le bouillon employé était d'une excellente qualité, car après avoir été placé 24 heures à 35°, il contenait une culture de charbon des plus abondantes.

Il ressort nettement de cette expérience que le changement brusque d'un milieu à un autre exerce une grande influence sur le microbe du charbon, à moins qu'on ne veuille y chercher la preuve du « pouvoir microbicide » du bouillon nutritif, ce qui, je pense, n'est encore venu à l'idée de personne.

Les résultats sont tout aussi frappants si, au lieu de bouillon, on prend de l'eau ordinaire bouillie ou de l'eau distillée. Voici le résultat de deux expériences faites avec l'eau distillée et l'eau bouillie des conduites d'eau de l'Institut Pasteur. La culture employée était une treizième génération du bacille du charbon dans du sérum stérilisé. La culture ne contenait pas de spores, bien entendu.

NOMBRE DES COLONIES.

	Plaque de contrôle.	1 heure.	2 heures.	20 heures.
Eau distillée.....	540	302	250	181
Eau ordinaire.....	622	233	195	132

Il y a une autre raison qui explique au moins en partie le pouvoir microbicide du sérum frais. C'est la quantité d'acide carbonique qu'il contient, et qui ne doit pas être moindre de 60 à 70 centièmes de son volume, vu la manière dont on prépare le sérum. On sait en effet, par les expériences de *Setchenoff*, que le sérum contient au moins les deux tiers de la quantité totale de l'acide carbonique du sang, et que le sérum absorbe encore la plus grande partie du CO^2 des globules rouges, quand le sang se coagule. Or, l'acide carbonique est un poison pour les microbes.

Pasteur et Joubert [1] ont démontré que la bactéridie y meurt. Leone [2] et Hochstetter [3] ont constaté que différentes espèces de microorganismes meurent très vite dans l'eau saturée de CO^2, et Buchner [4] a observé son influence funeste sur le bacille du choléra.

Il était donc très probable que l'acide carbonique du sérum frais devait jouer un certain rôle dans la mort des germes, et il m'a paru tout indiqué d'essayer quelle est son importance. J'ai trouvé que cette influence est considérable, car les liquides qu'on laisse traverser, même pendant un temps relativement court, par un courant d'acide carbonique, deviennent fortement microbicides. On peut, avec de petites quantités de CO^2, rendre le sérum de vache, stérilisé par chauffage, microbicide à un haut degré.

Voici, pour le prouver, quelques essais avec 10^{cc} de sérum

1. Études sur la maladie charbonneuse. *Comptes rendus*, 1877, p. 900.
2. *Archiv. f. Hygiene*, 1886, vol. IV.
3. *Id.*, vol. IV.
4. *Beitrage zur Kenntniss d. Neapelercholerabacillen. Id.*, 1885, vol. III.

stérilisé. qui s'était montré auparavant comme un excellent milieu de culture, et qu'on a fait traverser pendant une minute par un faible courant d'acide carbonique. J'y ai joint deux essais avec du bouillon nutritif, traversé également pendant une minute par un courant de CO^2.

NOMBRE DES COLONIES SUR PLAQUES DE GÉLATINE.

		Contrôle.	1 heure.	2 heures.	4 heures.
I	Sérum stérilisé.	539	12	55	191
II		692	110	72	120
III		247	156	159	155
IV		920	176	172	123
V	Bouillon nutritif.	437	203	125	102
VI		346	177	119	0
VII		179	77	61	0

L'acide carbonique dans le sérum est donc loin d'être aussi inoffensif qu'on a paru le croire. Son influence s'y fait moins sentir que dans le bouillon, où les germes rapportés sur la gélatine des plaques paraissent déjà tués après quatre heures de contact avec ce gaz [1], mais elle est si manifeste qu'on ne doit évidemment pas la négliger, quand on recherche les causes de la mort des germes dans le sérum. Cette influence de l'acide carbonique nous explique probablement en partie que ce pouvoir microbicide disparaît dans le sérum chauffé, qui ne contient que des traces de gaz.

Les expériences qui précèdent nous montrent quelle importance peuvent avoir des influences en apparence minimes sur la vie des microorganismes. Il est évident que dans une culture qui, pour notre œil, est composée d'individus qui tous sont du

1. Cette mort n'était qu'apparente, car les germes ont pu pousser et former des cultures assez abondantes dans les deux tubes après un séjour de 48 heures à 35°.

même aspect et de la même vigueur, il y en a qui sont déjà vieux et affaiblis et, par conséquent, bien moins résistants aux influences extérieures que les jeunes. Le sérum devient pour ainsi dire un réactif très délicat qui nous permet de faire cette distinction, en tuant les individus affaiblis pour ne laisser vivre que les jeunes et vigoureux.

S'il en est ainsi, il devenait intéressant de chercher comment poussaient dans le sérum de différents animaux certains germes pathogènes, semés en assez faible quantité pour que l'influence microbicide supposée du sérum pût se montrer, mais en même temps mis en garde contre les influences d'ordre physique, dont nous venons de voir la portée. Il était donc nécessaire d'employer toujours des germes empruntés à des cultures dans du sérum stérilisé, et des cultures où tous ou presque tous les individus étaient encore assez jeunes pour pouvoir résister. Il n'est malheureusement pas possible d'éviter l'influence de l'acide carbonique, car les moyens qui nous permettent de l'enlever (le vide, la chaleur, les substances chimiques) introduisent en même temps des changements dans la constitution du sérum.

Les essais faits dans cet ordre d'idées me semblent démontrer que l'influence microbicide du sérum lui-même est le plus souvent très faible. Mais il ressort en même temps de ces expériences que si le sérum frais n'exerce qu'une influence très restreinte sur les microbes, il n'en est pas de même pour les substances albuminoïdes du même sérum, car ces substances, en solution aqueuse, s'opposent, ou absolument ou pour un temps plus ou moins long, à la multiplication des microbes qu'on y ensemence.

Voici le détail de ces expériences. Les sérums examinés provenaient du lapin, du chien et du cheval. La prise du sang était toujours faite d'une manière aseptique et dans des vases stériles. Aussitôt le caillot formé, il était décollé de la paroi du vase, qui était placé à température basse pendant 24 heures. Le lendemain, quand le sérum s'était bien séparé du caillot, on le plaçait par quantité de deux centimètres cubes dans des tubes à essai stériles [1]. L'ensemencement était fait tout de suite après avec

1. Il faut employer des tubes à essai d'un certain calibre, car j'ai plusieurs fois observé un retard dans la croissance, quand on cultivait dans des tubes très

des quantités minimes de cultures âgées de 24 heures, dans du sérum. Ordinairement, on semait la gouttelette adhérente à une petite anse du fil de platine, ou on ensemençait seulement la quantité de liquide qui adhérait au fil trempé dans la culture.

Les espèces ensemencées étaient : *la bactéridie charbonneuse, le bacille de la fièvre typhoïde, le staphylococcus aureus, le bacille de la diphtérie, le bacille pyocyanique*. Les tubes étaient placés à une température de 35°.

L'ensemencement dans le sérum de ces cinq espèces donnait invariablement comme résultat des cultures visibles à l'œil nu, de vingt-quatre à quarante-huit heures après.

Les cultures n'étaient pas partout de la même abondance. Le bacille de la fièvre typhoïde pousse plus lentement que ceux du charbon et de la diphtérie. Le bacille pyocyanique m'a paru celui des cinq qui se développait avec le plus de vigueur. Il n'y avait pas de différence appréciable entre les sérums des trois espèces d'animaux. Les microbes poussaient aussi bien dans le sérum du chien que dans celui du lapin ou du cheval.

Ces résultats me semblent prouver que si le sérum des animaux employés possède un pouvoir bactéricide quelconque, celui-ci ne peut pas être bien grand, car le nombre des germes ensemencés n'était pas bien considérable en comparaison de la quantité du liquide employé (2cc), et les germes provenaient de cultures jeunes, qui ne contenaient pas encore de spores.

En face de résultats aussi nets, la question de savoir si le chauffage du sérum le rendrait encore plus avantageux comme milieu de culture, perdait beaucoup de son intérêt. J'ai néanmoins fait l'essai en ensemençant les cinq espèces dans le sérum de lapin et de cheval chauffé pendant 1 heure à 65°. Le résultat a été que j'ai obtenu des cultures abondantes 48 heures après, mais qui à l'œil nu ne paraissaient pas plus développées que des cultures dans le sérum frais du même âge.

Si le sérum frais s'est montré comme un bien meilleur milieu de culture qu'on n'eût pu le prévoir après les recherches de Buchner, les choses changent complètement d'aspect si, après avoir séparé du sérum ses substances albuminoïdes, on

étroits. Ce retard est sans doute dû à la difficulté avec laquelle la diffusion de l'oxygène de l'air se fait dans les liquides enfermés dans ces tubes.

ensemence les microbes dans la solution aqueuse de ces substances.

Le procédé que j'ai employé est le suivant. Le sérum frais du sang stérile est précipité avec trois fois son volume d'alcool fort. Le précipité, qui contient toutes les substances albuminoïdes du sérum et une partie des sels, est jeté sur un filtre, lavé à l'alcool et séché. Il ne faut pas laisser le précipité trop longtemps en contact avec l'alcool, ni le sécher trop, pour ne pas rendre les substances albuminoïdes insolubles dans l'eau. Une fois la plus grande partie de l'alcool évaporée, on dissout le précipité dans de l'eau distillée, en prenant autant d'eau qu'il y avait de sérum. Une partie du précipité se dissout dans l'eau : la quantité qui reste insoluble dépend surtout de la vitesse avec laquelle on a agi. On chasse les dernières traces d'alcool, qui restent dans la solution, en la faisant traverser par un courant d'air stérile, et on la filtre.

La solution obtenue par ce procédé est claire, légèrement jaunâtre, de réaction faiblement alcaline. Après l'avoir partagée dans les tubes, on l'ensemence avec les cinq espèces à examiner. Il va sans dire qu'il est essentiellement nécessaire de faire toutes ces manipulations dans des vases et des filtres stérilés.

Les ensemencements ont donné un résultat assez imprévu, car ces solutions se sont montrées très difficilement assimilables par les microorganismes qu'on y a introduits ; il y en a même qui n'y ont pas poussé du tout. Ceux qui y ont poussé ne l'ont fait qu'après un temps assez long (plusieurs jours). Le chauffage d'une heure à 60° rend ces solutions plus assimilables. Toutes les formes ensemencées y poussent, mais pourtant moins bien que dans le sérum ordinaire.

Voici le détail d'une de ces expériences, faite avec les substances précipitées du sérum du lapin, telle que je la trouve dans mes protocoles:

30 *janvier* 1891. — 30cc de sérum frais d'un lapin adulte sont précipités avec de l'alcool et jetés sur un filtre. Aussitôt l'alcool séparé, on dissout dans 30cc d'eau distillée. Presque tout se dissout. Après nouvelle filtration la solution est laissée 24 heures à 35° pour l'évaporation du restant d'alcool, et partagée ensuite dans douze tubes à essai : 2cc dans chacun. La moitié des tubes est chauffée pendant 1 heure à 65°. Après refroidissement, tous les tubes sont ensemencés avec de petites quantités (la contenance d'une

anse de platine) de *Staph. aureus*, de bactéridie, des bacilles de la fièvre typhoïde, de la diphtérie et du bacille pyocyanique. Ces semences provenaient de cultures dans du sérum du lapin, âgées de 24 heures. Ces tubes sont placés à 35°.

2 *février*. — Aucun développement visible dans les tubes.

4 *février*. — On observe aujourd'hui un faible développement dans les tubes *chauffés* qui contiennent du charbon, de la diphtérie et du bacille pyocyanique. Rien dans les tubes non chauffés.

8 *février*. — Dans les tubes non chauffés contenant la bactéridie et le bacille pyocyanique, on peut aujourd'hui observer un léger trouble.

11 *février*. — *Tubes chauffés*. — Fort développement dans les tubes contenant la bactéridie, le bacille pyocyanique et celui de la diphtérie. Le bacille de la fièvre typhoïde et le *Staphyl. aureus* n'ont pas poussé.

Tubes non chauffés. — Développement très faible de la bactéridie, du bacille pyocyanique, qui ne forme pas de couleur, et de la diphtérie. Rien dans les autres.

Les choses en sont restées au même point jusqu'au moment où la dessiccation du liquide a mis fin à l'expérience.

Si au lieu de dissoudre le précipité dans un volume d'eau égal au volume de sérum précipité, on le dissout dans un volume double, les microbes poussent avec plus de facilité, mais pourtant avec un retard très considérable (de cinq à huit jours), et toujours en donnant des cultures très maigres.

Comment expliquer ces faits? Tiennent-ils à ce que dans les précipités il n'y a qu'une partie des matières albuminoïdes du sérum, mais qu'il n'y a pas tous ses sels, ni ceux de ses matériaux qui sont solubles dans l'alcool concentré? Avec l'hypothèse qu'il y aurait dans le sérum des matières assimilables, par exemple des peptones, qui manqueraient dans le précipité alcoolique, on s'expliquerait pourquoi ces substances albuminoïdes ne sont plus assimilables en solution aqueuse, tandis que dans le sérum les microorganismes les transforment avec facilité, comme le démontrent les expériences de M. Perdrix [1].

Nous serions dans ce cas en face du phénomène que M. Duclaux a appelé l'influence de *premier établissement*. Ce qui veut dire qu'un microbe qui arrive dans un milieu nouveau a besoin d'y trouver toute préparée un peu de nourriture appro-

1. Sur la transformation des matières azotées dans les cultures de bactéridie charbonneuse. Ces *Annales*, vol. II, p. 354.

priée, qui lui permet de sécréter les diastases capables de rendre assimilables les autres matériaux albuminoïdes du milieu. Le sérum normal renferme, sans aucun doute, de ces matériaux analogues aux peptones. Il n'y en a que peu ou pas dans le précipité obtenu avec l'alcool, et ce fait pourrait donc expliquer pourquoi les germes n'arrivent pas à s'y développer. Mais l'explication est peut-être aussi à chercher dans des influences plus délicates, dont nous allons démontrer quelques exemples en étudiant les sucs de l'organisme.

J'ai essayé comment se comportaient les cinq espèces étudiées dans l'albumine d'œuf en état frais. Le blanc d'œuf était vidé dans un vase stérile, agité avec des perles en verre stériles, pour détruire les membranes, et placé dans des tubes à essai, qu'on ensemençait ensuite avec les cinq espèces. Le résultat a été que seul le bacille pyocyanique arrivait à un très faible développement. Aucun des autres ne se développait, et ils y étaient morts quelques jours après. Le blanc d'œuf est donc un microbicide par excellence. Si on mélange le blanc d'œuf avec parties égales d'eau distillée, le bacille pyocyanique s'y développe mieux, mais sans coloration bien distincte ; le charbon et le bacille diphtérique arrivent aussi à s'y développer faiblement. Le blanc d'œuf mélangé avec du bouillon alcalin et chauffé à 100° forme au contraire un excellent milieu de culture.

II

En face des résultats obtenus avec les substances albuminoïdes du sérum, il était tout indiqué d'essayer si celles des *organes* se comportent de la même manière.

Les essais que j'ai faits sur des lapins normaux, non réfractaires au charbon, en extrayant les substances albumineuses des organes, selon le procédé qui sera donné plus loin, démontrent que la solution aqueuse de ces albumines tue la bactéridie qu'on y introduit. Je ne saurais dire s'il s'agit ici des *globulines de défense* dont parle Hankin [1] et qu'il a extraites de la rate du lapin et du rat. Son procédé est différent du mien,

1. Ueber den schützenden Eiweisskörper der Ratte. *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. IX, 1891.

mais l'effet qu'il a observé sur la bactéridie est le même, car les solutions qu'il a obtenues restent stériles après ensemencement. Nous sommes probablement ici en présence des mêmes phénomènes que ceux que nous avons observés dans les solutions aqueuses des albumines du sérum, à savoir la difficulté des microbes à s'assimiler ces substances, quand on ne leur offre pas une autre nourriture à côté, car ces solutions ne s'opposent nullement au développement des germes, si on y ajoute des faibles quantités de bouillon nutritif.

Tout autres étaient les résultats obtenus avec des substances albumineuses extraites d'organes d'animaux *rendus réfractaires contre le charbon*. Ces substances non seulement s'opposent au développement de la bactéridie, mais elles ont un certain pouvoir antiseptique, en ce sens qu'elles empêchent le développement, même quand on les mélange avec du bouillon ou du sérum.

Un mot d'abord sur le procédé employé pour rendre réfractaires les lapins contre le charbon.

On sait, par les travaux de MM. Roux et Chamberland [1], que le sang des moutons morts de charbon et stérilisé par la chaleur ou par filtration sur porcelaine, contient des substances vaccinantes. La difficulté consiste à débarrasser le sang des bâtonnets vivants, qui sont très difficiles à tuer, sans altérer en même temps les substances vaccinantes. J'ai réussi à tuer la bactéridie dans le sang et dans les organes du lapin mort du charbon, en les stérilisant avec l'huile d'eucalyptus, qui n'altère pas les substances vaccinantes qu'ils contiennent [2].

Voici le procédé. Aussi tôt que possible après la mort d'un lapin tué avec le charbon, on l'ouvre et on enlève avec des instruments stériles le foie, le cœur, les poumons, les reins et la rate. Ces organes sont hachés finement, mélangés avec 100 cc d'eau distillée, et le tout placé pendant 24 heures

1. Sur l'immunité contre le charbon, conférée par des substances chimiques. Ces *Annales*, vol. III, 1888

2. Ce procédé repose sur un principe que je croyais nouveau, quand je l'ai essayé. Plus tard j'ai su que MM. Roux et Chamberland emploient depuis un certain emps un procédé analogue pour rendre réfractaires les lapins. Leur méthode. me paraît plus commode que la mienne, en ce sens que la stérilisation est obtenue plus vite et la solution plus facilement débarrassée de la substance stérilisante (l'essence de moutarde).

à une température assez basse pour empêcher la bactéridie de pousser. Après ce temps on filtre la solution sur du papier, et on ajoute 10cc d'essence d'eucalyptus pure. On agite et on laisse la solution jusqu'au moment où le liquide ensemencé dans du bouillon ne donne plus lieu à aucun développement [1]. Les bâtonnets sont ordinairement tués deux ou trois jours après qu'on a ajouté l'essence. A ce moment on se débarrasse de l'essence par filtration. Le filtratum obtenu est clair, rouge foncé. Il contient une petite quantité d'eucalyptus. Ce liquide renferme des substances vaccinantes, car si on l'inocule à un lapin, celui-ci devient réfractaire au charbon, qui tue les animaux de contrôle en 55 à 90 heures. Les animaux dont j'ai analysé les organes avaient revêtu une résistance très prononcée contre le charbon, car j'ai pu les inoculer plusieurs fois de suite avec des doses considérables de charbon très virulent, sans qu'ils en ressentent le moindre malaise.

EXPÉRIENCE.

29 *mars*. — Les organes d'un lapin, mort du charbon 65 heures après l'inoculation sous la peau, sont hachés, infusés avec 100cc d'eau, filtrés sur un filtre en toile métallique serrée, et mélangés avec 10cc d'huile d'eucalyptus.

2 *avril*. — Plusieurs ensemencements faits dans du bouillon avec des quantités considérables de liquide sont restés stériles. On peut donc considérer les bâtonnets comme morts. La couche d'essence sur la surface du liquide est enlevée par filtration sur du papier. Le liquide filtré est d'une couleur brun rouge. Il contient un petit précipité qui s'y forme après la filtration. On injecte 25cc sous la peau d'un lapin jeune. La température avant l'injection est de 39°,2; une heure après elle monte à 39°,9. Nouvelle injection de 25cc.

3 *avril*. — Température 40°,7. Un peu d'infiltration à l'endroit des injections, un peu d'œdème de la paroi abdominale. Nouvelle injection de 25cc.

4 *avril*. — Température 40°,2.

17 *avril*. — Nouvelle injection de 50cc du liquide provenant d'un lapin mort de charbon et traité comme plus haut. Température avant l'injection 39°,5, une heure après 40°,2.

18 *avril*. — Température 39°,8. Nouvelle injection de 30cc de la même solution.

19 *avril*. — Température 39°,3.

1. Des expériences de contrôle ont démontré que les faibles quantités d'huile d'eucalyptus dissoutes dans le liquide n'ont aucune influence sur le développement des bâtonnets dans le bouillon.

25 *avril.* — Six jours après la dernière injection, le lapin est inoculé avec 0,2cc d'une culture de charbon sur de la gélose. En même temps on inocule un lapin de contrôle.

26 *avril.* — Température 40°,2. A l'endroit de l'inoculation une petite tuméfaction œdémateuse.

27 *avril.* — Température 39°,9. L'infiltration est comme hier.

28 *avril.* — Température 39°,5. L'infiltration commence à disparaître. Le lapin de contrôle est trouvé mort (72 heures après l'infection). L'autopsie montre qu'il est bien mort du charbon.

5 *mai.* — Le lapin est inoculé de nouveau sous la peau près de l'oreille avec 0,2cc d'une culture de charbon, qui tuait un lapin de contrôle dans l'espace de 60 heures.

Les jours suivants aucune augmentation de la température. Il s'est formé une très petite infiltration à l'endroit de l'inoculation.

13 *mai.* — Nouvelle infection (la troisième) avec du charbon, en même temps qu'un cobaye, qui meurt 48 heures après.

Le lapin continue à bien se porter jusqu'au 20 mai, quand on le tue pour examiner ses organes.

La petite quantité d'essence qui se trouve dissoute dans le liquide n'a aucune influence sur la santé des lapins. Des expériences de contrôle ont démontré, en outre, que l'essence pure ou dissoute dans du sang normal ne peut pas conférer l'immunité.

Une autre méthode par laquelle j'ai rendu les lapins réfractaires contre le charbon est la suivante : Je me préparais des milieux de cultures composés de jaunes d'œufs, albumine d'œuf et de bouillon de veau faiblement alcalin en parties égales. Ce mélange est un excellent milieu de cultures pour la bactéridie, qui y pousse avec une vigueur extraordinaire, mais sans former de spores. Pour en extraire les susbtances vaccinantes, il ne faut pas laisser la culture se développer trop longtemps : cinq ou six jours à 30° suffisent. Si on dépasse ce temps, il se forme des substances toxiques nullement vaccinantes, qui tuent rapidement les lapins. Les cultures sont mélangées avec leur volume d'eau distillée et filtrée sur un filtre en porcelaine. Le liquide filtré, inoculé sous la peau d'un lapin, lui confère l'immunité contre le charbon. La quantité de liquide qu'il faut inoculer doit être à peu près le volume du liquide qu'on obtient d'une culture de 100cc. L'injection doit être faite en deux ou trois fois. Elle occasionne chaque fois une élévation de un ou un degré et demi de température. L'immunité obtenue par ce moyen n'est pas d'une longue durée et disparaît un mois à six semaines plus tard.

Elle est bien moins facile à obtenir qu'avec les extraits des organes charbonneux, et j'ai plusieurs fois observé que des lapins, rendus réfractaires par cette méthode, et qui avaient résisté à une inoculation virulente, ont fini par succomber après une nouvelle infection, avec des énormes œdèmes du ventre et des cuisses. La mort dans ces cas arrivait toujours très tard, jusqu'à dix jours après l'inoculation.

Les organes des lapins rendus réfractaires par une de ces méthodes contiennent des substances, qui en solution empêchent le développement du charbon qu'on y ensemence. Pour obtenir l'extrait de ces substances, voici exactement comment il faut procéder.

Le lapin dont on a éprouvé antérieurement l'immunité contre le charbon est tué avec de l'éther. Après la mort on enlève les organes (le cœur, les poumons, le foie, la rate, les reins) avec des instruments stériles, on les hache finement et on les mélange avec 50^{cc} de glycérine pure. Vingt-quatre heures après on filtre sur un filtre en toile métallique serrée. La solution glycérique, très chargée de substances albumineuses, est précipitée avec cinq fois son volume d'alcool fort. Aussitôt le précipité formé, il est filtré, lavé soigneusement avec de l'alcool fort pour enlever les dernières traces de glycérine, puis bien égoutté, enlevé du filtre et mélangé avec 25^{cc} d'eau distillée. Ce mélange contient encore une certaine quantité d'alcool, qu'il faut enlever en laissant traverser le liquide par un courant d'air, jusqu'au moment où tout l'alcool a disparu. Il va sans dire que toutes ces opérations doivent être faites d'une manière aseptique absolue, si on ne veut pas s'exposer à embrouiller les résultats en introduisant des germes étrangers dans le liquide. Quand l'alcool est bien enlevé, ce qui s'obtient facilement après avoir fait traverser la solution quelques heures par un courant d'air, on laisse le mélange reposer douze heures pour que la solution des substances se fasse, et on filtre. Le liquide obtenu par ce procédé est clair, légèrement jaunâtre, il bleuit faiblement le papier de tournesol. Chauffé à l'ébullition il se trouble; avec de l'alcool on obtient un précipité blanc, floconneux, en quantité assez faible.

Ce liquide, ensemencé avec du charbon, reste stérile, et ce qui est le plus curieux, il possède une certaine force antisep-

tique, car même mélangé avec du sérum ou du bouillon nutritif, il empêche le développement du charbon qu'on y ensemence. Si le liquide nutritif dépasse de deux tiers la quantité de la solution du suc d'organes, la bactéridie commence à pouvoir s'y développer, mais avec un retard considérable.

A quoi attribuer ce phénomène? Nous avions cru d'abord à une faute de préparation, qui aurait pu l'expliquer ; mais le même fait s'est toujours montré, quoique la solution fût préparée avec les plus grands soins. Le précipité alcoolique fut soigneusement débarrassé de la glycérine par plusieurs lavages à l'alcool, les dernières traces de l'alcool lui-même furent enlevées, bref le liquide ne contenait pas autre chose qu'une solution de substances albuminoïdes et quelques sels, qui ne peuvent certainement pas nuire.

Sommes-nous ici en présence de phénomènes analogues à ceux que nous avons observés dans les solutions aqueuses des substances albuminoïdes du sérum normal ou, ce qui me paraît plus probable, s'agit-il ici d'une diastase formée sous l'influence des substances vaccinantes dans l'organisme du lapin? La solubilité dans la glycérine pourrait y faire penser, ainsi que l'influence de la chaleur, car un chauffage à 75° détruit son pouvoir microbicide. Mais nous avons déjà vu combien ces questions sont délicates. Nous sommes donc restreints à des suppositions d'autant plus difficiles à résoudre que la substance n'est pas facile à obtenir à l'état de pureté, et qu'elle ne se trouve qu'en quantité très faible. Une chose est certaine, c'est que cette substance n'est pas la même que la substance vaccinante, qu'on trouve dans le sang et dans les organes des animaux morts de charbon, et qui ne possède aucun pouvoir microbicide.

Nos connaissances sur la chimie des substances azotées de l'organisme normal sont déjà tellement vagues, qu'il serait plus que téméraire de se prononcer sur la nature d'une substance fabriquée dans un organisme malade sous l'influence de substances vaccinantes dont la constitution chimique nous échappe également.

SUR LA SUBSTANCE BACTÉRICIDE DU SANG

DÉCRITE PAR LE PROFESSEUR OGATA,

PAR M. LE Dr PETERMANN.

(Travail du laboratoire de M. Roux à l'Institut Pasteur.)

MM. Fodor, Nuttal, Voit, Buchner et Hankin ont appelé l'attention sur le pouvoir bactéricide du sang. MM. Buchner, Hankin, Ogata, et d'autres auteurs, sont parvenus, par diverses méthodes, à isoler certaines parties du sérum qui jouissent de la propriété bactéricide à un haut degré.

Une revue détaillée du travail du professeur Ogata et du docteur Jasuhara (publié dans les *Mittheilungen d. Med. Facultat d. Kaiserl. Jap. Universität*), a été faite par le professeur Lœffler dans le n° 1 du *Centralblatt für Bacteriologie*, 1891.

MM. Ogata et Jasuhara donnent l'immunité pour le charbon aux souris blanches et aux cobayes, en leur injectant du sérum de chien.

Dans un nouvel article sur le pouvoir bactéricide du sang, publié dans les nos 18 et 19 du tome IX du *Centralblatt für Bacteriologie*, le professeur Ogata décrit une méthode qui permet d'extraire du sang et du sérum des substances, donnant l'immunité contre le charbon et le rouget du porc. Celle qui préserve du charbon est retirée du sang de chien, celle qui rend réfractaire au rouget provient du sang de poule. Il donne le nom de « ferments » à ces substances, contenues dans le sérum des animaux réfractaires, et il leur attribue les caractères suivants :

« 1. La substance bactéricide est facilement soluble dans l'eau et la glycérine; par contre, elle ne l'est pas dans l'alcool et l'éther. Elle n'est pas détruite par l'addition de ces derniers liquides.

« 2. Les alcalis faibles ne diminuent point son pouvoir bactéricide, qui est complètement détruit par de petites quantités d'acides phénique ou chlorhydrique.

« 3. Il l'est aussi par le chauffage à 45°.

« 4. Cette substance a un pouvoir tout aussi bien désinfectant que vaccinant, et elle le conserve sans altération sensible pendant très longtemps si on y ajoute de la glycérine.

« 5. Elle n'a pas le pouvoir de convertir la fibrine en peptone ni l'empois d'amidon en sucre. »

M. Ogata pense que ces propriétés doivent faire regarder comme des euzymes les substances qu'il a pu extraire du sérum de chien et du sang de poule au moyen de la glycérine (extrait glycériné).

Quoique cet extrait, d'après le professeur Ogata, « ne soit pas un corps chimiquement pur », il faut néanmoins reconnaître que l'isolement de substances actives sous forme d'extrait glycériné est un progrès notable.

Voici la méthode de préparation de cet extrait glycériné, décrite par le professeur Ogata et employée par nous :

On ajoute, à une partie de sang de poule ou de sérum de chien, 10 à 15 parties d'un mélange (à parties égales) d'alcool absolu et d'éther. Après deux jours, on filtre et on laisse sécher à l'air le résidu. On pulvérise la masse séchée et on y ajoute de l'eau tiède, ou un mélange à parties égales d'eau et de glycérine ; la quantité de ce mélange doit correspondre à la moitié de celle du sang ou du sérum employée. Après 5 minutes, on exprime la masse à travers un linge et on filtre sur du papier à filtrer. On ajoute à la substance filtrée un mélange d'alcool et d'éther en quantité 10 fois plus grande, on agite ; après un jour il se forme un résidu floconneux, blanc, que l'on recueille sur filtre.

On délaye le précipité dans un volume d'eau glycérinée (eau et glycérine parties égales) deux fois moindre que celui du sang ou du sérum utilisés. L'extrait aqueux-glycériné ainsi préparé est injecté aux animaux.

Le Dr Enderlen, dans un article publié dans le *Münchener med. Wochenschrift*, n° 18, 1891, reproduit les expériences du premier travail du prof. Ogata. Il obtient des résultats opposés qui démontrent que le sérum du chien n'a pas le pouvoir de vacciner les souris blanches et les cobayes contre le charbon. Mais, comme le Dr Enderlen s'est servi de cultures charbonneuses plus virulentes que celles de M. Ogata, il a pu ne pas remarquer le pouvoir vaccinant du sérum de chien, trop faible sans doute pour produire

une préservation appréciable contre le charbon très virulent.

Nous nous sommes placés dans des conditions semblables à celles qu'indique M. Ogata ; nos souris ont été éprouvées avec le premier vaccin et nos cobayes avec le deuxième vaccin de l'Institut Pasteur. La matière d'inoculation, destinée aux souris, était puisée dans le sang ou la rate d'une souris qui venait de mourir du premier vaccin, après une maladie de trois jours. Les cobayes étaient inoculés avec le sang ou la pulpe de la rate de souris qui avaient succombé en 24 heures au second vaccin charbonneux. Les virus que nous avons employés n'étaient donc pas trop forts.

Le sang de chien était puisé dans la carotide, dans des conditions de pureté parfaite. Il était placé pendant 24 heures dans la glacière et on décantait le sérum bien séparé du caillot. Les chiens employés comme fournisseurs de sérum, étaient inoculés avec un charbon asporogène très virulent, après qu'ils étaient complètement rétablis de la saignée qui leur avait été pratiquée. On avait ainsi la preuve qu'ils étaient tout à fait réfractaires au charbon ; par conséquent leur sérum devait se trouver dans les meilleures conditions pour posséder la propriété vaccinante dont parle M. Ogata.

Dans la préparation de l'extrait glycériné, nous avons suivi strictement les indications de M. Ogata. Cet extrait a été expérimenté sur les souris et les cobayes, qui en ont reçu des doses variables, soit en même temps que le virus, soit après des temps plus ou moins longs après l'inoculation.

Les tableaux ci-dessous présentent le résumé de nos expériences. L'injection du sérum ou de l'extrait préventif a été pratiquée, tantôt à l'endroit même où on inoculait les microbes, tantôt dans le voisinage ou dans un point opposé. Quelle que soit la façon dont on a procédé, on voit à l'inspection de nos tableaux, que ni le sérum, ni l'extrait glycériné du sang de chien, n'ont arrêté le charbon chez les souris ou chez les cobayes. Les animaux traités sont, en général, morts avant les témoins, bien que les virus employés fussent assez faibles pour ne pas faire périr tous les témoins. A l'autopsie nous avons toujours constaté la présence de la bactéridie à l'état de pureté dans le sang et dans la rate.

Nos expériences sur le rouget ont porté sur les pigeons et les souris. Nous ferons d'abord observer que c'est évidemment par erreur que M. Ogata dit qu'il a inoculé aux pigeons le bacille

de la septicémie des souris. Il veut parler du bacille du rouget du porc, car celui de la septicémie des souris ne tue pas les pigeons, et c'est précisément une des différences qui le distinguent du microbe du rouget qui fait périr ces oiseaux à coup sûr, mais qui est inoffensif pour les poules.

Nous nous sommes procurés le sang, en le puisant directement dans le cœur d'une poule qui venait d'être sacrifiée par piqûre du bulbe. Le sang était défibriné par agitation avec des perles de verre dans un vase stérilisé. L'extrait glycériné du sang de poule a été obtenu comme nous l'avons dit plus haut, d'après la méthode de M Ogata. Les poules qui nous ont servi avaient été inoculées quelques semaines auparavant avec de fortes doses de cultures virulentes de rouget : on était donc assuré qu'elles étaient tout à fait réfractaires à cette maladie. Les pigeons et les souris blanches ont été inoculées avec des virus d'énergie différente, pris dans des cultures ou dans la rate de souris mortes du rouget.

Les tableaux qui se trouvent à la fin de ce travail permettent de se rendre rapidement compte de nos expériences. Pas plus que pour le charbon, nous n'avons réussi à reproduire les résultats du professeur Ogata. Ni le sang défibriné de poule, ni l'extrait glycériné n'ont vacciné les souris blanches et les pigeons contre le rouget du porc, même peu virulent. Ces animaux mouraient avec des bacilles du rouget dans la rate et dans le sang. On serait plutôt porté à croire que les injections du sang et du sérum des animaux naturellement réfractaires à cette maladie, ne font que faciliter l'action du virus. Il en est de même de l'extrait glycériné; le fait s'est reproduit d'une façon trop constante pour qu'on le regarde comme accidentel. Est-il dû à une influence dépressive exercée sur l'organisme des souris et des pigeons par l'introduction du sang d'une espèce différente? Ou bien les substances ainsi injectées agissent-elles d'une façon nuisible sur les organes excréteurs (les reins par ex.) de l'animal inoculé? Il faudrait de nouveaux essais pour résoudre ces questions.

Quoi qu'il en soit, de ce que nous venons de rapporter, il résulte que le sérum du sang de chien, animal réfractaire au charbon, n'est pas capable d'arrêter l'évolution de la maladie charbonneuse chez la souris et chez le cobaye. Le sang défibriné de poule, animal réfractaire au rouget, n'empêche pas davantage le développement de cette maladie chez le pigeon et la souris blanche.

Inoculation du charbon et injection de sérum du sang de chien.

Nos DES ANIMAUX et des expériences	INOCULATION DU CHARBON	QUANTITÉ DE SÉRUM de chien injecté	Moment de l'injection du sérum avant ou après le charbon	MORT APRÈS inoculation DU CHARBON	OBSERVATIONS
1re *Expérience. Souris.*					
I. De contrôle.	1/4cc. 1er vaccin rate.			46 h.	Le virus a été retiré de la rate et du sang d'une souris morte du charbon, 1 vaccin, 62 h. après inoculation.
II. Souris.	1/4cc. 1er vaccin rate.	1/2 goutte de sérum.	1 h. avant le virus.	42 h.	
III. —	1/4cc. 1er vaccin rate.	1 goutte de sérum.	1/2 h. avant le virus.	26 h.	
IV. —	1/4cc. 1er vaccin rate.	2 gouttes de sérum.	en même temps.	39 h.	
V. —	1/4cc. 1er vaccin rate.	3 gouttes de sérum.	en même temps.	20 h.	
2e *Expérience. Cobayes.*					
VI. De contrôle.	1/4cc. 2e vac. bouillon.			n'est pas mort.	Inocul. du charbon 2e vaccin, culture dans le bouillon, sérum injecté dans différents endroits.
VII. Cobaye.	1/4cc. 2e vac. bouillon.	1/4cc. de sérum.	15′ avant le virus.	65 h.	
VIII. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	1/2cc. de sérum.	15′ avant le virus.	55 h.	
IX. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	1cc. de sérum.	15′ avant le virus.	38 h.	
X. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	2cc de sérum.	15′ avant le virus.	65 h.	
XI. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	3 1/2cc. de sérum.	15′ avant le virus.	78 h.	
3e *Expérience. Cobayes.*					
XII. De contrôle.	1/4cc. 2e vaccin rate.			65 h.	Inocul. du charbon rate et sang de souris du 2e vaccin en 20 heures.
XIII. Cobaye.	1/4cc. 2e vaccin rate.	1/2cc de sér. du même côté que le virus.	en même temps.	60 h.	
XIV. —	1/4cc. 2e vaccin rate.	1/2cc. sérum du côté opposé.	en même temps.	72 h.	
XV. —	1/4cc. 2e vaccin rate.	1cc. sérum du même côté.	en même temps.	36 h.	
XVI. —	1/4cc. 2e vaccin rate.	1cc. sérum du côté opposé.	en même temps.	65 h.	
4e *Expérience. Cobayes.*					
I. De contrôle.	1/4cc. 2e vac. bouillon.			69 h.	Inocul. du charbon 2e vaccin, culture dans le bouillon. Inoculation du sang du chien défibriné.
II. Cobaye.	1/4cc. 2e vac. bouillon.	1cc. sang défibr. du même côté.	15′ avant le virus.	49 h.	
III. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	1cc. sang défibr. de l'autre côté.	15′ avant le virus.	47 h.	
IV. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	2cc. sang défibr. du même côté.	15′ avant le virus.	60 h.	
V. —	1/4cc. 2e vac. bouillon.	2cc. sang défibr. de l'autre côté.	15′ avant le virus.	64 h.	

Inoculation du charbon et injection d'extrait glycériné du sérum du chien.

Nos DES ANIMAUX et des expériences.	INOCULATION DU CHARBON 1er et 2e vaccin.	QUANTITÉ DE L'EXTRAIT glycériné injecté.	Moment de l'injection de l'extrait avant ou après le virus.	MORT APRÈS inoculation DU CHARBON.	OBSERVATIONS.
1re *Expérience. Souris.*					
I. De contrôle.	1/4 cc. charb. 1er vaccin.			32 h.	Sang et rate de souris morte du charb 1er vaccin, 38 h. après l'inoculation. Les injections du virus et de l'extrait dans différents endroits.
II. Du contrôle.	1/8 cc. charb. 1er vaccin.			30 h	
III. Souris.	1/4 cc. charb. 1er vaccin.	1/4 goutte d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	30 h.	
IV. —	1/8 cc. charb. 1er vaccin.	1/4 goutte d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	37 h.	
V. —	1/4 cc. charb. 1er vaccin.	1/2 goutte d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	18 h. 1/2	
VI. —	1/8 cc. charb. 1er vaccin.	1/2 goutte d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	11 h	
VII. —	1/4 cc. charb. 1er vaccin.	1 goutte d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	17 h	
VIII. —	1/4 cc. charb. 1er vaccin.	2 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	6 h.	
2e *Expérience. Cobayes.*					
I. De contrôle.	1/4 cc. charb. 2e vaccin.			68 h.	Inoculation de rate de souris morte du charbon, 2e vaccin, en 22 h. après l'inoculation.
II. Cobaye.	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	2 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	63 h.	
III. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	3 gouttes d'extr. glyc.	15′ après le virus.	82 h.	
IV. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	3 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	56 h.	
V. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	4 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	59 h.	
VI. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	5 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	59 h.	
3e *Expérience. Cobayes.*					
I. De contrôle.	1/4 cc. charb. 2e vaccin.			42 h.	Inoculation de rate du cobaye I inoculé du charbon, 2e vaccin et mort en 68 heures.
II. Cobaye.	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	2 1/2 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	45 h.	
III. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	3 gouttes d'extr. glyc	15′ après le virus.	40 h.	
IV. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	3 gouttes. d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	38 h.	
V. —	1/4 cc. charb. 2e vaccin.	4 gouttes d'extr. glyc.	15′ avant le virus.	40 h.	

Inoculation du charbon et injection du sérum de chien.

Nos des animaux et des expériences.	Inoculation du charbon virulent.	Quantité du sérum de chien injecté.	Moment de l'injection du sérum avant ou après le virus	Mort après inoculation du charbon.	Observations
7e *Expérience. Cobayes.*					Inoculation du charbon virulent, culture dans le bouillon.
XVII. Décontrôle.	1/4cc charb. vir.-bouil.			36 h.	
XVIII. Cobaye	1/4cc charb. virulent.	1/2cc de sérum avec.	en même temps.	36 h.	
XIX. —	1/4cc charb. virul.	1cc de sérum avec.	en même temps.		
XX. —	1/4cc charb. virul.	2cc de sérum avec.	en même temps.	42 h.	
XXI. —	1/4cc charb. virul.	3cc de sérum avec.	en même temps.	37 h.	

Inoculation du rouget du porc et injection de sang de poule défibriné.

Nos des animaux et des expériences.	Inoculation du rouget du porc.	Quantité du sang de poule inoculé.	Moment de l'injection du sérum avant ou après le rouget de porc	Mort après inoculation du rouget.	Observations
1re *Expérience Souris.*					Virus-pulpe de rate de souris morte du rouget dans 48 h. Inoculat. dans différents endr.
I. De contrôle.	1/4cc sous-cutané.			40 h.	
II. Souris.	1/4cc sous-cutané.	1/2 goutte de sang.	1 h. après le virus.	35 h.	
III. —	1/4cc sous-cutané.	1 goutte de sang.	en même temps.	42 h.	
IV. —	1/4cc sous-cutané.	2 gouttes de sang.	15′ avant le virus.	28 h.	
2e *Expérience. Pigeons.*					Culture virulente du rouget dans bouillon, sang et virus dans le même pect.
I. Décontrôle,	1/4cc dans le pectoral.			60 h.	
II. Pigeon.	1/4cc dans le pectoral.	1cc de sang de poule.	5′ après le virus.	60 h.	
3e *expérience. Pigeons.*					Culture non virulente dans le bouillon. Ces pigeons ont résisté après à des inoculations virul. successives.
III. Décontrôle.	1/2cc dans le pectoral.			n'est pas mort.	
IV. Pigeon.	1/2cc dans le pector. droit.	1 1/2cc sang de poule, le pect. gauche.	en même temps.	69 h.	
V. —	1/2cc dans le pector. droit.	2cc de sang de poule, le pect. gauche.	en même temps.	60 h.	

Nos DES ANIMAUX et des expériences.	INOCULATION du rouget du porc.	QUANTITÉ DU SANG de poule inoculé.	Moment de l'injection du sérum avant ou après le rouget du porc	MORT APRÈS inoculation DU ROUGET	OBSERVATIONS
1e *Expérience. Pigeons.*					La même culture que dans l'expérience précédente, sang et virus dans le même pectoral.
VI. De contrôle.	1/2cc dans le pectoral.			n'est pas mort.	
VII. Pigeon.	1/2cc dans le pectoral.	1cc de sang de poule.	en même temps.	72 h.	
VIII. —	1/2cc dans le pectoral.	1cc de sang de poule.	en même temps.	60 h.	
3e *expérience. Pigeons.*					Pulpe de rate de souris morte du rouget, 28 h. après. Le sang dans le pectoral opposé.
IX. De contrôle.	1/2cc dans le pectoral.			60 h.	
X. Pigeon.	1/2cc dans le pectoral.	1 1/2cc sang de poule.	3′ av. virus.	60 h.	
XI. —	1/2cc dans le pectoral.	2cc sang de poule.	—	36 h.	
6e *Expérience. Pigeons.*					Culture du rouget virulent dans le bouillon. Le sang a été inoculé dans le même pectoral que le virus.
XII. De contrôle.	1/4cc dans le pectoral.			68 h.	
XIII. Pigeon.	1/4cc dans le pectoral.	1/4cc sang de poule.	10′ av. virus.	68 h.	
XIV. —	1/4cc dans le pectoral.	1/2cc sang de poule.	—	60 h	
XV. —	1/4cc dans le pectoral.	3/4cc sang de poule.	—	94 h.	
XVI. —	1/4cc dans le pectoral.	1cc sang de poule.	—	68 h.	
XVII. —	1/4cc dans le pectoral.	2cc sang de poule.	—	60 h.	

Inoculation du rouget du porc et injection d'extrait glycériné du sang de poule.

Nos DES ANIMAUX et des expériences.	INOCULATION DU rouget du porc.	Quantité de l'extrait glycériné du sang de poule.	Moment de l'injection de l'extrait glycériné avant ou après le virus.	MORT APRÈS inoculation DU VIRUS	OBSERVATIONS
1re *Expérience. Souris.*					Inoculation de la pulpe de rate de souris morte 38 h. après inoculation.
I. De contrôle.	1/4cc. Rouget rate.			40 h.	
II. Souris.	1/4cc. Rouget rate.	1/2 goutte d'extr. glycériné.	1 h. avant le virus.	36 h.	
III. —	1/4cc. Rouget rate.	1 gtte d'extr. glycériné.	en même temps.	42 h.	
IV. —	1/4cc. Rouget rate.	2 gttes d'extr. glycériné.	15′ avant le virus.	28 h.	

Nos des animaux et des expériences.	Inoculation du rouget du porc.	Quantité d'extrait glycériné du sang de poule.	Moment de l'injection de l'extrait glycériné avant ou après le virus.	Mort après l'inoculation du virus	Observations
2e *Expérience. Souris.*					
V. De contrôle.	1/4cc. Rouget rate.			39 h.	Inoculation de la pulpe de rate de la souris I. (précédente expér.).
VI. Souris.	1/4cc. Rouget rate.	1/4 goutte d'extr. glycériné.	en même temps.	35 h.	
VII. —	1/4cc. Rouget rate.	1/2 goutte d'extr. glycériné.	15′ avant le virus.	42 h.	
VIII. —	1/4cc. Rouget rate.	1 gtte d'extr. glycériné.	15′ avant le virus.	29 h.	
IX. —	1/4cc. Rouget rate.	1 gtte d'extr. glycériné.	30′ avant le virus.	26 h.	
3e *Expérience. Pigeons.*					
X. De contrôle.	1/4cc. Rouget rate.			76 h.	Inoculation de la pulpe de rate de souris morte du rouget dans 28 h.
XI. Pigeon.	1/4cc. Rouget rate.	2 gttes d'extr. glycériné.	1 h. 20′ avant le virus.	54 h.	
XII. —	1/4cc. Rouget rate.	3 gttes d'extr. glycériné.	en même temps.	62 h.	
XIII. —	1/4cc. Rouget rate.	4 gttes d'extr. glycériné.	15′ avant le virus.	47 h.	
4e *Expérience. Pigeons.*					
XIV. De contrôle.	1/4cc. Rouget rate.			68 h.	Inoculation de la pulpe de rate et sang de pigeon X (précédente expérience).
XV. Pigeon.	1/4cc. Rouget rate.	1/4cc. d'extr. glycériné.	10′ avant le virus du même côté.	69 h.	
XVI. —	1/4cc. Rouget rate.	1/2cc. d'extr. glycériné.	10′ avant le virus du côté opposé.	66 h.	
XVII. —	1/4cc. Rouget rate.	1cc. d'extr. glycériné.	10′ avant le virus du même côté.	47 h.	
5e *Expérience. Pigeons.*					
XVIII. De contrôle.	1/2cc. Rouget bouillon.			62 h.	Inoculation de culture du rouget, dans le bouillon, âgée de deux jours.
XIX. Pigeon.	1/2cc. Rouget bouillon.	1/2 gtte d'ext. glycériné.	10′ avant le virus du même côté.	47 h.	
XX. —	1/2cc. Rouget bouillon.	1 gtte d'extr. glycériné.	10′ avant le virus du côté opposé.	62 h.	
XXI. —	1/2cc. Rouget bouillon.	2 gttes d'ext. glycériné.	10′ avant le virus du même côté.	60 h.	
XXII. —	1/2cc. Rouget bouillon.	3 gttes d'ext. glycériné.	10′ avant le virus du côté opposé.	60 h.	
XXIII. —	1/2cc. Rouget bouillon.	4 gttes d'ext. glycériné.	10′ avant le virus du même côté.	72 h	

INFLUENCE DU SANG DE GRENOUILLE

SUR LA

RÉSISTANCE DES SOURIS CONTRE LE CHARBON

PAR M. LE Dr ROUDENKO, DE MOSCOU.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Lorsqu'il s'agit de l'action bactéricide que le sang, ou le sérum d'un animal réfractaire à une maladie infectieuse, exerce sur le microbe de celle-ci, on cite souvent les faits rapportés par MM. Ogata et Jasuhara [1].

Ces observateurs affirment que le sang des animaux qui ont l'immunité naturelle contre le charbon, tels que la grenouille, le rat et le chien, atténue la bactéridie qui se développe dans ce sang. Cette propriété atténuatrice serait tellement active, que les souris inoculées avec le charbon ne prennent pas la maladie, si on a eu soin de leur injecter une goutte de sang ou de sérum de grenouille ou une demi-goutte de sérum de chien.

Pour nous former une opinion sur ce sujet, nous avons répété les expériences de MM. Ogata et Jasuhara sur l'influence du sang et du sérum sanguin des grenouilles dans l'infection charbonneuse des souris. Puisque les savants japonais se sont servis de bactéridies qui ne tuaient que des souris, nous avons fait nos expériences avec le premier vaccin charbonneux de l'Institut Pasteur; nous avons même choisi la variété la plus faible, qui n'est point mortelle pour toutes les souris. Nous nous sommes servis de cultures fraîches de ce vaccin dans du bouillon de veau sans peptone.

Sur 22 souris, 9 ont servi de témoins et n'ont reçu que quel-

1. Nous nous sommes servi du rapport de M. Löffler dans le nº 1 du *Centralblatt für Bacteriologie*, 1891, p. 25.

ques gouttes, 0,25 ou 0,5cc de culture sous la peau. Toutes sont mortes dans un espace de temps qui a varié de 1 à 11 jours, sauf une qui est restée vivante, bien qu'elle ait reçu une quantité de 0,5cc de culture.

Des 13 souris d'expérience une seule a survécu, elle avait reçu une goutte de sang de grenouille, une heure après l'inoculation avec quelques gouttes de culture charbonneuse. Les 12 autres souris sont toutes mortes du charbon généralisé les unes avant, les autres après leurs témoins. Le résultat a été le même avec diverses doses (de 1 goutte à 0,25cc) de sang défibriné ou de sérum de grenouille, soit que l'on injecte le sérum en même temps que la culture charbonneuse, soit que l'injection soit faite séparément.

Puisque la seule souris d'expérience qui a survécu a été inoculée dans les conditions les moins favorables (le sang a été introduit une heure après la bactéridie), il est évident que sa résistance était aussi accidentelle que celle de la souris témoin.

Vu la grande uniformité de nos résultats, nous avons trouvé inutile de prolonger ces expériences, dont la conclusion est diamétralement opposée à l'assertion de MM. Ogata et Jasuhara. On voit bien que *le sang et le sérum de la grenouille ne sont point en état de préserver les souris, même contre le virus charbonneux très faible.*

	SOURIS D'EXPÉRIENCE.			SOURIS TÉMOINS.	
Quantité de culture du 1er vaccin.	Quantité de sang ou de sérum de grenouille injecté.	Issue.	Poids du cadavre.	Issue.	Poids du cadavre.
			gr.		gr.
0,5cc	2 gouttes de sang.	† Mort en 4 jours.	24,5	† Mort en 2 jours.	26,0
0,5	0,25 de sang.	† en 24 h.		Survie.	
0,25	2 gouttes de sang.	† en 3 jours.	15,5	† en 11 jours.	17,0
Quelques gouttes.	2 gouttes de sang.	† en 4 jours.	8,5	† en 5 jours.	9,0
—	2 gouttes sérum.	† en 24 h.	9,5	† en 3 jours.	9,0
—	2 g. sérum 1 heure avant l'inoculation.	† en 3 jours.	9,0	† en 2 jours.	8,5
—	1 g. de sang 1 heure après l'inoculation.	Survie.			
—	1 g. de sang 1 heure avant l'inoculation.	† en 3 jours.	8,5	† en 24 h.	8,5
—	1 g. de sang 1 heure après l'inoculation.	† en 6 jours.	9,0		
—	1cc sérum.	† en 4 jours.	9,0	† en 2 jours.	9,5

DE L'IMMUNITÉ — IMMUNITÉ ACQUISE

ET

IMMUNITÉ NATURELLE

DIRCOURS PRONONCÉ AU CONGRÈS D'HYGIÈNE ET DE DÉMOGRAPHIE DE LONDRES

SÉANCE DU 12 AOUT (SECTION DE BACTÉRIOLOGIE),

PAR M. E. ROUX.

Messieurs,

En invitant un élève de M. Pasteur à parler aujourd'hui devant vous de l'immunité, le comité d'organisation de ce congrès s'est souvenu que les progrès faits sur ce sujet, dans ces dernières années, ont eu pour point de départ la découverte des virus atténués et des inoculations préventives.

Comment, en effet, étudier l'immunité si nous ne pouvons la donner à volonté? Nous devons donc commencer par exposer rapidement les procédés d'immunisation; car c'est de l'immunité acquise que nous nous occuperons tout d'abord, puisqu'elle se prête mieux à une étude expérimentale.

Autrefois la seule manière de conférer l'immunité était l'inoculation du virus même de la maladie; seule la vaccination Jennerienne faisait exception. Au procédé d'immunisation, si souvent dangereux, qui consiste à employer le virus tel que la nature nous l'offre, M. Pasteur a ajouté celui des inoculations préventives par virus atténués.

L'atténuation peut être graduée au gré de l'expérimentateur, de façon à fournir des variétés de microbes plus ou moins actifs, mais capables de transmettre à leurs descendants leur virulence atténuée. Le nom de virus atténué doit être réservé aux virus qui restent atténués dans leurs générations successives. Un virus peut, en effet, devenir inoffensif sans être pour cela un virus atténué. Il suffit que les microbes qui le constituent soient atteints dans leur vitalité, qu'ils germent lentement, pour ne causer aucun mal aux animaux; mais ce virus ainsi modifié retrouve aussitôt ses qualités meurtrières quand il

est rajeuni par la culture ; au contraire, l'atténuation véritable est héréditaire.

M. Pasteur a fait connaître deux méthodes principales pour atténuer les virus, à savoir : l'action prolongée de l'air sur les cultures faites à une température convenable et le passage par des espèces animales différentes. On a employé dans le même but l'action de la chaleur, des antiseptiques, de l'oxygène comprimé, de la dessiccation et de la lumière. Tous ces procédés, Messieurs, vous sont familiers et leurs auteurs vous sont bien connus; je ne les décrirai donc pas, je me bornerai à faire remarquer qu'en général, pour obtenir une atténuation vraie, il faut que l'action atténuatrice s'exerce lentement; les actions rapides et brutales peuvent rendre un virus inoffensif, il est exceptionnel qu'elles lui impriment l'atténuation héréditaire.

Quelle que soit, d'ailleurs, la manière dont il est préparé, le virus atténué pour conférer l'immunité est introduit dans le corps; il faut qu'il vive au contact des tissus de l'animal pour le préserver. L'immunisation par virus vivant a été découverte la première et elle est encore la seule employée pratiquement; mais, depuis quelques années nous connaissons un autre procédé pour donner l'immunité. Dans cette méthode nouvelle, au lieu d'injecter aux animaux la culture vivante, on sépare les microbes qu'elle contient, ou bien on les fait périr, pour ne garder que les produits qu'ils ont élaborés pendant leur vie. Ce mode d'immunisation est appelé vaccination chimique par opposition à la vaccination microbienne, il a été tenté d'abord par M. Pasteur pour le choléra des poules et par M. Toussaint pour le charbon. M. Chauveau a puissamment contribué à l'établir. Mais, la vaccination chimique a été définitivement démontrée par les recherches de MM. Salmon, Woolridge, Beumer, Charrin, Chamberland et Roux, Chantemesse et Widal, Gamaleïa, C. Fraenkel...

Il n'est donc pas nécessaire, pour que l'état réfractaire soit acquis, que les microbes pénètrent dans le corps, il suffit que les substances préparées dans les cultures artificielles y soient introduites. Si donc, en pullulant dans l'organisme, les microbes donnent l'immunité, c'est sans doute parce qu'ils y fabriquent ces mêmes produits chimiques que nous trouvons dans les cultures *in vitro*.

Lorsque les cultures privées de microbes sont injectées à dose trop forte, elles provoquent chez les animaux des symptômes tout à fait semblables à ceux que l'on observe dans la maladie spontanée. D'où il est naturel de conclure que les microbes parasites agissent par leurs produits chimiques, véritables poisons spécifiques pour chacun d'eux, et qui déterminent chez l'homme et chez les animaux le tableau symptomatique de la maladie. La virulence des microbes est non seulement leur aptitude à vivre dans le corps des animaux, mais encore la pro-

priété qu'ils ont d'y former des toxines. Plus les microbes sont virulents, plus ils sont toxigènes, et parmi eux, ceux qui causent les maladies les plus terribles se distinguent comme fabricants de poisons particulièrement actifs. La maladie infectieuse est donc un empoisonnement; la source du poison est le microbe installé dans les tissus; il y élabore sa toxine aux dépens de la substance même de l'être vivant qu'il va faire périr. Une preuve qu'il en est ainsi, c'est que nous pouvons retirer du cadavre les poisons que nous trouvons dans les cultures.

La culture stérilisée d'un microbe virulent donne, suivant les doses, la maladie ou l'état réfractaire. La connaissance des substances contenues dans ces cultures est donc d'une importance très grande pour l'étude de l'immunité. Pour mettre leur action en évidence, il faut supprimer celle du microbe vivant qui les accompagne. Nous pouvons, par exemple, tuer le microbe par la chaleur ou le séparer mécaniquement par la filtration, à la condition toutefois qu'en nous débarrassant des bactéries, nous n'altérions pas, du même coup, les substances qu'elle ont formées. Les produits microbiens sont souvent très altérables : si quelques-uns supportent des températures élevées, il en est d'autres qui sont déjà modifiés à 50°, température impuissante à tuer sûrement les microbes; or il suffit que quelques-uns persistent pour que la conclusion de l'expérience soit faussée. La filtration sur la bougie Chamberland rend de grands services dans ces recherches, mais elle n'est pas toujours applicable; elle retient sûrement les microbes, mais parfois elle arrête aussi les matières chimiques qui restent fixées à la terre poreuse. Les bactériologistes sont donc souvent embarrassés pour savoir si un liquide contient ou non de ces corps délicats que les manipulations détruisent : cela est surtout vrai quand on opère sur le sang ou les liquides de l'organisme. Un procédé qui nous a réussi consiste à tuer les microbes par des essences. Celles-ci n'altèrent point les matières albuminoïdes ni les diastases, et elles ont un pouvoir antiseptique très énergique, ainsi que l'ont établi M. Koch, M. Chamberland et d'autres expérimentateurs. Les essences d'ail et de moutarde, par exemple, malgré leur faible solubilité dans les liquides, font promptement périr les microbes qui ne forment pas de germes. De plus, ces essences sont volatiles; quand elles ont agi, on évapore le liquide dans le vide, il reste un résidu qui n'a subi aucune réaction brutale et qui renferme les produits microbiens fixes. Du sang charbonneux, de la pulpe de rate charbonneuse traités par l'essence de moutarde donnent aux moutons et aux lapins l'immunité contre le charbon. Pour obtenir ce résultat avec les mêmes liquides filtrés ou chauffés à 58°, il faudrait en injecter des doses bien plus fortes. M. Foa a trouvé dans les organes des lapins morts de pneumonie des produits capables de donner l'immunité contre cette maladie : il est facile de réaliser

cette vaccination chimique avec la rate et le sang d'un lapin pneumonique après qu'on a tué les pneumocoques par l'essence. Nous pensons que l'usage de ces antiseptiques volatils pourra rendre des services dans bien des cas [1].

Une autre difficulté dans l'étude des produits microbiens, c'est qu'ils ne se forment pas toujours dans nos milieux artificiels. Dans les cultures du *bacillus anthracis* en bouillon, il n'y a pas de matières actives en quantité appréciable; elles sont, au contraire, faciles à mettre en évidence dans une culture faite dans du sang défibriné, surtout si on a pris comme semence la bactéridie asporogène dont on peut ensuite facilement se débarrasser. Les microbes n'élaborent donc pas les mêmes produits dans tous les milieux, et tel qui fait facilement des poisons dans le corps des animaux n'en forme plus que très peu dans nos bouillons nutritifs.

Quelle est la nature de ces corps actifs préparés par les microbes, et qui jouent un rôle si important dans la production de l'immunité? Au début des travaux sur ce sujet, on était disposé à les considérer comme des alcaloïdes, et M. Brieger a isolé plusieurs ptomaïnes des cultures microbiennes. Aujourd'hui on a reconnu que, dans la majorité des cas, les substances actives sont des matières protéiques et se rapprochent des diastases. Leur activité est tout à fait comparable à celle des enzymes; dans les liquides les plus toxiques elles n'existent souvent qu'en quantité inpondérable. Elles sont difficiles à isoler et encore trop peu définies comme espèces chimiques pour que leur analyse nous renseigne d'une façon précise. Nous devons applaudir aux efforts des expérimentateurs tels que MM. Brieger, Woolridge, Hankin qui ont entrepris de les préparer. Il serait, en effet, du plus haut intérêt de les avoir à l'état de pureté pour bien régler leur action, surtout si, comme il est permis de le prévoir, elles entrent dans la thérapeutique.

Nous avons dit, Messieurs, qu'une même culture privée de microbes, pouvait, selon les doses injectées, être vaccinante ou toxique. Les substances qui tuent sont-elles les mêmes que celles qui immunisent? Vous concevez toute l'importance d'une semblable question; en effet,

1. La macération de jéquirity introduite sous la peau des lapins les tue rapidement et à très petites doses. Les animaux aussi intoxiqués sont souvent envahis par des microbes, même non pathogènes, qui se trouvent dans le liquide injecté. Pour éviter ces infections secondaires, nous avons préparé des solutions de jéquiritine dépourvues de microbes au moyen de l'essence de moutarde, sans que la substance active, si délicate, soit altérée. Cette jéquiritine a beaucoup d'analogie avec certains poisons microbiens, ou encore avec les venins; aussi son étude est interessante pour les microbiologistes. On peut donner l'immunité pour le poison du jéquirity comme pour les toxines des microbes. On y réussit, chez les lapins, en injectant d'abord la macération de jéquirity traitée par les alcalis. Elle devient ainsi beaucoup moins toxique et elle les rend plus résistants à la jéquiritine ordinaire.

si la matière vaccinante est différente de la matière toxique, il suffira de l'isoler de celle-ci, pour conférer avec elle l'immunité sans danger. M. Bouchard pense qu'il en est ainsi, et son idée est très séduisante. Il n'y a rien d'impossible, *a priori*, à ce qu'un microbe en vivant dans un milieu y produise plusieurs corps, les uns bienfaisants, les autres nocifs. MM. Charrin et Arnaud ont donné l'immunité aux lapins contre la maladie pyocyanique avec des substances retirées des cultures et qui ne paraissaient plus toxiques; cependant la partie de la culture qui renfermait le poison vaccinait à petite dose. M. Ch. Fränkel rend les cobayes réfractaires à la diphtérie en leur injectant le liquide toxique des cultures chauffé à 65°; M. Roger constate que les cultures d'érysipèle chauffées à 100° sont toxiques et ne vaccinent pas, mais qu'elles donnent l'immunité après avoir été portées à 110°. Dans ces deux cas la chaleur aurait détruit le poison et laissé le vaccin. On ne peut cependant pas dire que l'on ait encore complètement réussi à séparer la fonction préservatrice de la fonction toxique. Les substances vaccinantes dérivent probablement des toxines modifiées et d'ailleurs elles ne sont point inoffensives à fortes doses.

L'immunité produite par les vaccins chimiques est-elle aussi durable que celle qui est donnée par les vaccins vivants? Nous manquons d'expériences assez étendues pour nous prononcer définitivement, nous pouvons dire toutefois que, pour le charbon et la pneumonie, l'état réfractaire donné par les microbes vivants persiste plus longtemps que celui qui est conféré par les produits solubles.

Au début des essais sur la vaccination chimique, on pensait qu'elle donnerait une sécurité plus grande que la vaccination microbienne, puisqu'elle n'introduit rien de vivant dans le corps et qu'avec elle il n'y a pas à redouter ces retours à la virulence que l'on peut craindre avec les virus atténués. On n'a pas été longtemps à s'apercevoir que l'injection des produits microbiens n'est pas sans danger, même quand on ménage les doses; certains, qui sont bien supportés d'abord, agissent à longue échéance et causent des dégénérescences qui peuvent devenir meurtrières.

Maintenant, Messieurs, que nous avons passé en revue les divers procédés d'immunisation, demandons-nous comment ils agissent et quels sont les changements qui font d'un animal réceptif un animal réfractaire? On a comparé tout d'abord les modifications produites dans l'organisme immunisé à celles qui ont lieu dans un milieu inerte où les microbes ont vécu. Dans cette conception simple, l'individu sensible à la maladie est un milieu de culture favorable, et l'individu rendu réfractaire est un milieu impropre à la vie du microbe. Celui-ci, en vivant une première fois dans le corps, a épuisé certains matériaux qui lui sont nécessaires, ou bien il y a laissé certaines substances qui lui sont

nuisibles. Les expériences que nous avons rapportées, sur la vaccination chimique, ont définitivement écarté la première explication en même temps qu'elles ont fourni un appui à la seconde. Ces substances empêchantes que l'on invoquait tout d'abord à titre d'hypothèse, sont précisément ces produits que les microbes élaborent dans l'organisme des animaux comme dans les milieux artificiels, et qui donnent l'immunité. Restés dans les tissus ils entraveraient une nouvelle croissance des virus et produiraient l'état réfractaire. Pour vérifier s'il en est ainsi, retirons un peu de sang des vaisseaux d'un lapin vacciné contre le charbon et ensemençons-le avec de la bactéridie. Celle-ci y pullule rapidement : il n'y a donc pas dans le sang de cet animal réfractaire au charbon de substance qui s'oppose à la vie du bacille de cette maladie. Cette expérience est grossière, il est vrai, car il y a une différence très grande entre le sang circulant dans les vaisseaux et celui qui est sorti du corps. Pour la faire d'une façon plus délicate, mettons la bactéridie sous la peau de l'oreille ou dans la chambre antérieure de l'œil de notre lapin vacciné, elle y croît très bien, elle donne un grand nombre de bâtonnets dans les premières heures, mais elle ne se généralise pas. Le corps des animaux qui ont l'immunité n'est donc pas un milieu impropre au développement du virus.

Pourquoi celui-ci ne s'y répand-il pas? On en a cherché la raison dans l'action nuisible que certaines humeurs de l'économie exerceraient sur les microbes, action qui a été désignée sous le nom de bactéricide. Les bacilles du charbon, par exemple, périssent en grand nombre si on les met en contact avec du sang défibriné de lapin. Il est aisé de le constater : introduisons des bactéridies dans du sang, prélevons aussitôt un volume connu du mélange et ensemençons-le dans de la gélatine que nous étalons sur des plaques. Le nombre des colonies nous fait connaître la quantité de bacilles au début de l'expérience. Une seconde numération nous montre, que déjà après une demi-heure de contact avec le sang, beaucoup de bactéridies ont péri, car les colonies sont bien moins nombreuses qu'au premier ensemencement. Ces expériences, faites d'abord par M. Fodor, ont été vérifiées et étendues par MM. Nuttal et Nissen. M. Buchner, pénétrant plus avant dans cette étude, a fait voir que dans le sang, c'est surtout le sérum qui possède la propriété de nuire aux bactéries. De ce que le sang du lapin est bactéricide pour le *bacillus anthracis,* il n'y a rien à conclure sur le mécanisme de l'immunité, puisque le lapin n'est pas réfractaire au charbon. Mais bientôt cette propriété bactéricide a été étudiée chez les animaux naturellement réfractaires et chez les animaux immunisés; on a avancé que chez eux elle était beaucoup plus marquée que chez les animaux réceptifs. C'est M. Charrin qui a porté le premier la question sur ce terrain en cultivant par comparaison le bacille pyocyanique

dans le sérum de lapins vaccinés et dans le sérum de lapins neufs. La culture se fait bien dans les deux cas, mais elle subit dans le sérum de l'animal réfractaire des modifications spéciales.

Le travail le plus complet sur la propriété bactéricide des humeurs, est celui de MM. Behring et Nissen, qui ont examiné l'action du sérum d'un grand nombre d'animaux sur les microbes pathogènes; c'est donc à lui que nous emprunterons nos exemples. Le chien, réfractaire au charbon, fournit un sérum qui n'est pas nuisible aux bactéridies, ainsi que MM. Charrin et Roger l'avaient déjà signalé, tandis que le lapin, qui prend le charbon, donne, surtout s'il est vieux, un sérum bactéricide pour le même microbe. Le sérum d'un mouton vacciné contre le charbon, n'est pas plus bactéricide vis-à-vis du *bacillus anthracis* que le sérum d'un mouton neuf. De même, M. Lubarsch a retiré du corps d'un lapin un sérum très meurtrier pour la bactéridie, et cependant ce lapin a succombé, quand il a été inoculé du charbon, après qu'il était déjà rétabli de la saignée qu'on lui avait pratiquée. Nous pourrions multiplier ces exemples qui prouvent qu'il n'y a pas toujours concordance entre la propriété bactéricide des humeurs et l'immunité soit naturelle, soit artificielle.

Mais les faits les plus intéressants à examiner sont ceux où l'accord existe entre l'état réfractaire et le pouvoir microbicide. MM. Behring et Nissen ont trouvé que le sérum du cobaye sensible à l'action du *vibrio Metchnikowii*, n'est pas bactéricide pour ce microbe, tandis que le sérum du même animal vacciné l'est au plus haut degré. Rien n'est plus saisissant que la démonstration qu'ils donnent de ce fait : le sérum de l'animal immunisé tue les vibrions en quelques heures. Cet effet si marqué *in vitro*, devrait être plus rapide encore dans le corps de l'animal réfractaire. Il n'en est rien, et M. Pfeiffer a vu que le *vibrio Metchnikowii*, introduit sous la peau d'un animal vacciné, était encore vivant après 90 heures. M. Metchnikoff a maintes fois constaté que le vibrion se cultivait dans le tissu cellulaire de cobayes absolument réfractaires à la septicémie vibrionienne. Même après 48 heures, il a vu que les vibrions étaient vivants dans l'exsudat et qu'ils se développaient dans celui-ci lorsqu'il était retiré du corps. Voici donc que cette action bactéricide, si active en dehors du corps, ne s'exerce que bien mal dans l'organisme lui-même.

M. Behring recommande à tous ceux qui veulent se convaincre du pouvoir bactéricide des humeurs, d'étudier à ce point de vue le sérum du rat. La bactéridie filamenteuse que l'on mêle à ce sérum meurt très vite, les spores de charbon qu'on y ajoute n'y donnent, le plus souvent, aucune culture; de sorte que le sérum du rat agit sur le bacille du charbon comme un véritable antiseptique. Cette action énergique ne s'exerce pas seulement *in vitro*, mais aussi dans l'orga-

nisme. Des souris inoculées avec des spores mises en suspension dans du sérum de rat, prennent le charbon avec un long retard ou ne le prennent pas, ainsi que M. Hankin l'a montré. Cependant, les souris sont parmi les animaux les plus sensibles au charbon, et il faut que l'action thérapeutique du sérum de rat soit bien puissante pour les préserver. Le rat est, dit-on, un animal réfractaire au charbon et la propriété bactéricide exceptionnelle de ses humeurs est d'accord avec l'immunité dont il jouit.

Et d'abord, Messieurs, le rat blanc qui sert dans ces expériences est-il aussi résistant au charbon qu'on le répète souvent? MM. Lœffler, Straus, Lubarsch, Metchnikoff et bien d'autres expérimentateurs ont fait périr des rats du charbon. Ils résistent mieux que nos autres rongeurs de laboratoire, mais ils succombent fréquemment malgré leur sérum microbicide. D'ailleurs, le pouvoir bactéricide de leur sérum ne correspond pas nécessairement au degré de leur résistance au charbon; les jeunes rats, qui ont une réceptivité plus grande, donnent cependant un sérum qui agit parfois comme celui des rats adultes. Mais ce qui prouve bien que les choses ne se passent pas dans l'être vivant comme en dehors de l'organisme, c'est que les spores ou les bactéridies adultes croissent toujours quand on les introduit sous la peau d'un rat; en quelques heures elles donnent un œdème volumineux qui peut, il est vrai, disparaître dans la suite. Si on porte la bactéridie dans le corps du rat, au point même où le pouvoir bactéricide doit s'exercer avec le plus d'intensité, c'est-à-dire dans le sang, l'animal meurt le plus souvent du charbon après un temps plus ou moins long. Nous avons vu, M. Metchnikoff et moi, des rats, dont le sang empêchait l'évolution de la bactéridie chez des souris, périr du charbon après l'infection par la jugulaire. Bien plus, des bactéridies, mélangées au sérum d'un rat, sont injectées sous la peau d'un autre rat : ce dernier n'éprouve aucun mal, n'a pas d'œdème, tandis que le rat fournisseur du sérum thérapeutique succombe au charbon. Le sang, dans ce cas, manifestait au dehors du corps des propriétés microbicides qu'il n'avait pas dans l'organisme. Nos rats avaient un sérum capable de préserver les souris du charbon, mais impuissant à les sauver eux-mêmes.

Pour MM. Ogata et Jasuhara le sang de la grenouille et du chien sont si actifs pour détruire la bactéridie charbonneuse, qu'une seule goutte, ou une demi-goutte, préserve une souris du charbon si on la lui injecte sous la peau, même cinq heures après l'infection. Malgré plusieurs essais, nous n'avons pas pu reproduire ces surprenants effets thérapeutiques.

Cependant, Messieurs, il est certain que l'on peut retirer du corps des substances protéiques nuisibles aux bactéries; M. Hankin les a préparées et a montré leur action. Leur connaissance conduira sans

doute à d'importantes conséquences thérapeutiques, mais elle ne nous explique pas l'immunité. On trouve ces protéides défensives dans la rate du lapin sensible au charbon et dans celle du rat plus résistant. Il semble même qu'elles n'ont toute leur activité que lorsqu'elles sont isolées des organes au moyen des réactifs. Prenons la rate d'un rat qui vient d'être sacrifié, au lieu de la traiter par une solution de sulfate de soude et de précipiter par l'alcool, broyons-la rapidement avec de l'eau pure et ajoutons des bactéridies au liquide ainsi obtenu. Une souris qui reçoit ce mélange périt du charbon comme la souris témoin.

Le problème de l'immunité n'est pas résolu par le pouvoir bactéricide des humeurs, peut-être sera-t-il expliqué par une autre propriété que l'on a nommée atténuatrice? Les virus introduits dans le corps des animaux réfractaires y perdraient leur virulence et deviendraient inoffensifs. Cette atténuation se produirait et dans le cas de l'immunité naturelle et dans celui de l'immunité acquise. C'est ainsi que l'on a avancé que les bacilles du charbon perdent leur virulence dans le corps de la grenouille qui est insensible à cette maladie; mais M. Lubarsch a pu retirer des bactéridies tout à fait actives du corps d'une grenouille, trente-trois jours après les y avoir introduites. Dans ces expériences, on reprend dans les tissus de l'animal réfractaire les microbes que l'on y a insérés; beaucoup peuvent avoir péri et on est exposé à faire l'inoculation d'épreuve avec un petit nombre de microbes plus ou moins modifiés. Si l'animal qui les reçoit ne succombe pas, il ne faut pas en conclure qu'il y a eu atténuation. Pour éviter cette cause d'erreur il faut faire d'abord une culture : si le virus a été réellement atténué dans le corps, sa culture sera atténuée. En opérant ainsi, M. Lubarsch n'a vu qu'exceptionellement la bactéridie atténuée par un séjour prolongé dans l'organisme de la grenouille et du chien. Les expériences si connues du laboratoire de M. Pasteur, sur le retour à la virulence, ont appris que pour rendre leur activité aux microbes atténués il n'y a qu'à les faire passer par des espèces animales de plus en plus résistantes. Ainsi, le charbon qui a passé par le bœuf est plus virulent que celui qui a passé par le cobaye, et celui qui a passé par le chien, animal réfractaire, est plus meurtrier encore. Nous avons préparé, autrefois, M. Chamberland et moi, un charbon d'une virulence excessive pour les lapins et les moutons en cultivant la bactéridie sur une série de jeunes poulets de plus en plus âgés; M. Metchnikoff a augmenté l'activité de la même bactéridie en la faisant passer par des pigeons, ces oiseaux sont cependant assez résistants au charbon. Une observation du laboratoire de M. Pasteur a montré que le microbe du choléra des poules, après un long séjour dans un abcès formé chez un cobaye réfractaire, était encore mortel pour les poules adultes.

Dans le corps des animaux qui ont acquis l'immunité, les virus ne

s'affaiblissent pas davantage; il y a de nombreux exemples qui prouvent plutôt qu'ils s'y renforcent. M. Metchnikoff a inoculé le charbon dans la chambre antérieure de l'œil et sous la peau de lapins réfractaires, la bactéridie y est restée virulente, car, portée directement sous la peau d'autres lapins, elle les a fait périr rapidement. L'organisme réfractaire finit par tuer les virus, mais il n'exerce point sur eux cette influence atténuatrice par laquelle on a voulu expliquer l'immunité[1].

Messieurs, une des découvertes les plus intéressantes qui aient été faites dans ces derniers temps, et qui est présente à tous vos esprits, est celle de MM. Behring et Kitasato. Ils ont trouvé que le sang des lapins vaccinés contre le tétanos avait la propriété de neutraliser le poison tétanique. Ce sang, ou le sérum qu'on en retire, est capable non seulement de détruire de grandes quantités de toxine tétanique *in vitro*, mais aussi de donner aux souris l'immunité contre la maladie. Voici, Messieurs, un fait que tout le monde peut aisément vérifier et qui est assurément inattendu. L'immunité des lapins vaccinés contre le tétanos serait due à la présence dans le corps de cette substance toxinicide, véritable contrepoison d'une admirable efficacité. Une substance toxinicide analogue se trouverait aussi, d'après M. Behring, chez les animaux réfractaires à la diphtérie. Existe-t-il de semblables contrepoisons pour les autres maladies infectieuses[2], et pouvons-nous fonder sur eux une explication satisfaisante de l'immunité? Remarquons, d'abord, que le tétanos comme la diphtérie, sont deux maladies très spéciales, d'un type bien différent des infections ordinaires; les microbes qui les causent ne se répandent pas dans le corps, ils restent au point où ils ont été introduits et n'agissent que par leurs toxines qui diffusent dans l'organisme. Il y a une différence très grande entre ces maladies toxiques par excellence et celles où la mort ne survient que lorsque le parasite s'est multiplié d'une façon prodigieuse dans le sang et dans les organes. Une explication de l'immunité qui convient pour le tétanos et la diphtérie ne doit pas être étendue, sans examen, à toutes les maladies infectieuses. D'ailleurs, les expériences de M. Vaillard ont montré que l'immunité pour le tétanos pouvait exister

1. Une expérience, moins probante sans doute au point de vue qui nous occupe, mais assurément très originale, a été faite par M. Nocard. Les chèvres laitières succombent facilement au charbon, si on leur injecte de la bactéridie virulente dans la mamelle, par le conduit du trayon, sans produire de blessure. La même inoculation est inoffensive chez une chèvre vaccinée; mais la bactéridie introduite dans la glande y reste vivante pendant un temps encore indéfini (plus de deux mois). Le lait de chaque traite est charbonneux; inoculé à des moutons, il leur donne un charbon mortel. Pendant cette longue série de générations dans une humeur d'un animal immunisé, le *bacillus anthracis* n'a pas été affaibli.

2. D'après les expériences de MM. Foà et Carbone sur la pneumonie, le sérum des lapins vaccinés est capable d'arrêter le développement de la maladie chez des animaux déjà inoculés avec le pneumocoque.

sans qu'il y ait pouvoir toxinicide du sang et des humeurs. Les poules sont absolument réfractaires au tétanos, le microbe et sa toxine sont sans effet sur elles, cependant le sang des poules n'est pas toxinicide. Il n'acquiert ce pouvoir que si l'on a injecté à la poule du poison tétanique et il est alors d'autant plus marqué que l'on a donné davantage de toxine. La substance qui neutralise le poison tétanique n'existe donc pas naturellement chez la poule réfractaire; elle provient de la toxine tétanique introduite dans son corps. Même chez les lapins vaccinés contre le tétanos, le pouvoir toxinicide tient à la manière dont l'immunité leur est donnée. Il existe, quand l'état réfractaire a été produit par l'injection de liquide toxique chauffé à 60° ou traité par le trichlorure d'iode ou bien encore par l'iode seul; mais, on ne le constate pas si l'immunité a été conférée par l'inoculation, sous la peau de la queue, de spores tétaniques privées de toxine et additionnées d'acide lactique [1].

Considérons maintenant, d'autres maladies à toxines, la septicémie vibrionienne par exemple. M. Gamaleïa nous a appris que les cobayes vaccinés contre cette affection, sont aussi sensibles au poison du *vibrio Metchnikowii* que les cobayes neufs. MM. Charrin et Gamaleïa ont constaté la même chose pour la maladie pyocyanique. De même M. Selander, dans son étude sur le Hog-Cholera, fait périr les lapins réfractaires au microbe, avec des doses de poison égales à celles qui tuent les lapins ordinaires. Dans ces cas il n'y a pas de propriété toxinicide chez les animaux vaccinés.

Malgré le grand intérêt qu'il présente, ce pouvoir toxinicide, qui promet les plus beaux résultats pour la thérapeutique, n'est pas assez général pour que l'on puisse appuyer sur lui une théorie de l'immunité.

Jusqu'ici, Messieurs, les explications de l'immunité que nous avons examinées s'appuient surtout sur des expériences faites en dehors de l'organisme vivant. Considérons maintenant ce qui se passe dans le corps même et cherchons, par comparaison, ce que deviennent les virus introduits dans les tissus d'un animal réceptif et dans ceux d'un animal qui a l'immunité. Inoculons sous la peau, à la même heure, la bactéridie virulente à un lapin ordinaire et à un lapin vacciné. Retirons de temps en temps l'exsudat, qui se forme au point de l'inoculation, pour le regarder au microscope. Chez le lapin sensible au charbon, déjà après quelques heures, les bacilles ont pullulé, et un œdème s'est formé; le liquide qui le constitue est transparent, il contient des bacilles et à côté de ceux-ci des leucocytes. Peu à peu l'œdème aug-

1. M. Vaillard a aussi constaté que l'immunité contre le tétanos pouvait être héréditaire. il l'a trouvée chez des cobayes et des lapins issus de parents rendus réfractaires par l'injection de toxine tétanique chauffée à 60°, puis de toxine active.

mente, les ganglions voisins se tuméfient, les bacilles passent dans le sang ; alors, la mort est proche. Chez le lapin vacciné, les bactéridies se développent aussi dans les premiers moments ; le liquide exsudé, clair d'abord, se trouble ensuite, il renferme des cellules migratrices qui deviennent de plus en plus nombreuses, tandis que les bacilles libres diminuent. Bientôt, on ne trouve presque plus de bâtonnets entre les cellules, la plus grande partie est contenue dans les leucocytes. Quelques-uns de ceux-ci en sont comme remplis et dans leur intérieur on voit les bactéridies se modifier. Pendant que ces phénomènes se passent au point d'inoculation, le lapin ne manifeste aucun malaise, et il ne prend point le charbon. Si nous répétons les mêmes observations non plus sur un lapin vacciné, mais sur un chien, animal naturellement réfractaire, nous assisterons au même spectacle. Que l'immunité soit acquise ou qu'elle soit naturelle, nous constatons le même afflux de leucocytes, le même englobement des bacilles.

M. Metchnikoff, qui a découvert tous ces faits, a donné aux cellules qui dévorent les microbes le nom expressif de phagocytes. La propriété essentielle des phagocytes, c'est d'avoir des mouvement amiboïdes qui leur permettent d'introduire les corpuscules étrangers dans leur intérieur. Les diverses variétés de globules blancs, les cellules endothéliales sont des phagocytes. Ces cellules ont une origine commune, le mésoderme ; elles ont aussi une propriété commune qui est de pouvoir digérer les corps qu'elles ont ingérés. De toutes les cellules des animaux supérieurs, elles sont les seules qui manifestent encore la digestion intra-cellulaire. En effet, si nous suivons le sort des bactéridies dans l'intérieur des phagocytes, nous voyons qu'elles y subissent une série d'altérations spéciales, bien différentes de celles qu'elles éprouvent quand elles périssent dans les cultures. C'est d'abord un gonflement, puis un effacement des contours, suivis d'une digestion véritable.

Ces faits, Messieurs, ne sont pas particuliers au charbon, ils se produisent de même avec tous les microbes pathogènes, soit que nous inoculions les microbes virulents à des animaux résistants, soit que nous injections des microbes atténués à des animaux sensibles. Plus l'animal sera réfractaire, plus les microbes seront rapidement englobés par les leucocytes. Mais si, au contraire, l'animal ne résiste pas, si l'infection est rapide, les microbes restent libres ; il n'y a pas de phagocytose.

Il semble donc que les phagocytes soient chargés de la défense de l'organisme et qu'ils engagent une lutte véritable contre les parasites.

Mais, dira-t-on, il y a des maladies où les microbes se trouvent surtout dans les cellules et qui sont cependant mortelles. Qui ne sait, que dans la septicémie des souris et le rouget des porcs, les bacilles sont en grand nombre dans les leucocytes ? Dans la tuberculose, dans

la lèpre, les cellules sont le siège habituel des bacilles, et ces affections sont des plus graves, malgré la phagocytose intense qu'on y observe. Cela prouve, Messieurs, que les phagocytes, comme tous les moyens de défense, sont parfois impuissants. Ils ont fait de leur mieux en englobant les microbes, mais ceux-ci se sont adaptés au milieu intérieur des cellules et ils ont triomphé. Il ne suffit pas, en effet, que les microbes soient absorbés pour que l'organisme soit sauvé, il faut qu'ils soient digérés. Même dans ces cas, où la lutte ne tourne pas à l'avantage de l'organisme, ce sont encore les phagocytes qui l'ont entreprise. On voit souvent, dans la tuberculose et la lèpre, des bacilles qui ont subi, dans l'intérieur des cellules, des altérations qui attestent qu'il y a eu résistance. La théorie des phagocytes dit bien qu'il y a combat entre les microbes et les cellules, mais elle ne prétend pas que celles-ci doivent toujours l'emporter.

La phagocytose s'exerce chez les animaux réfractaires et elle ne se fait pas, ou se fait incomplètement, chez les animaux réceptifs. Je crois que ce fait n'est plus contesté par personne. Mais, quelle interprétation faut-il en tirer ? L'immunité est-elle la conséquence de cette propriété des cellules d'englober les virus, ou cette absorption des virus par les cellules n'est-elle possible que parce que l'immunité existe déjà ? Nous savons, en effet, que les leucocytes saisissent volontiers les corps inertes qu'ils rencontrent, les débris d'organes comme la poudre de carmin ou celle de charbon. Si, dans l'organisme réfractaire, ils englobent les microbes, c'est peut-être parce que ceux-ci sont dans des conditions défavorables et restent quasi inertes dans ce milieu qui ne leur convient pas; dans l'organisme réceptif, au contraire, où les microbes trouvent de bonnes conditions d'existence, ils ne sont pas englobés.

J'ai moi-même autrefois exprimé l'opinion qu'il en est ainsi, mais des faits nombreux ont été produits, qui démontrent que les microbes saisis par les cellules ne sont point dégénérés mais en pleine vitalité. On observe, par exemple, chez les grenouilles, une septicémie causée par des bacilles très mobiles, qui sont souvent incorporés dans les leucocytes ; on a pu voir les bacilles s'agiter encore dans l'intérieur du protoplasma et marquer par leurs mouvements qu'ils avaient été absorbés vivants. Voici encore une autre preuve : l'exsudat, retiré du corps d'une poule ou d'un lapin vacciné puis inoculé avec la bactéridie virulente, montre au microscope de nombreux leucocytes emprisonnant des bacilles. Ceux-ci croissent sous l'œil de l'observateur, dans l'intérieur même des phagocytes qui ont péri, et en s'allongeant ils entraînent le protoplasma, déforment la cellule et finissent par faire saillie au dehors.

Les phagocytes absorbent les microbes non seulement vivants mais

encore virulents. M. Metchnikoff a réussi à obtenir une culture du charbon en ensemençant dans du bouillon un leucocyte isolé qui contenait une bactéridie charbonneuse, et cette culture était virulente. D'ailleurs, n'avons-nous pas déjà vu que les microbes retirés des animaux réfractaires avaient parfois une virulence accrue, comme s'ils s'étaient renforcés dans la lutte avec les cellules?

Les phagocytes ne jouent donc pas simplement le rôle de balayeurs de choses inertes. Ce n'est pas quand les microbes sont morts qu'ils surviennent, mais dès l'entrée de ceux-ci dans l'organisme, alors que les parasites ont toute leur activité.

Une autre démonstration de l'importance de l'action phagocytaire c'est que, même chez l'animal réfractaire, les microbes pullulent, s'ils sont préservés de l'atteinte des leucocytes. Ainsi, dans la chambre antérieure de l'œil d'un lapin vacciné, où il n'y a pas de cellules, les bactéridies poussent très bien, et leur développement n'est arrêté que lorsque les leucocytes émigrés en quantité les ont incorporées. Un virus charbonneux très faible, comme le premier vaccin, croît facilement dans l'humeur aqueuse d'un lapin vacciné tant que les cellules migratrices n'interviennent pas. Introduisons, maintenant, des spores charbonneuses sous la peau du même lapin vacciné, après les avoir enfermées dans un petit sac de papier ou après les avoir déposées au centre d'un flocon de ouate. Les liquides exsudés pénètrent facilement jusqu'aux spores, mais les phagocytes sont arrêtés pendant quelque temps, par la paroi de papier ou les brins du coton. Les spores germent et donnent des cultures dans leur enveloppe protectrice, au milieu des humeurs du lapin réfractaire, tandis que toutes les spores et tous les bacilles, qui se trouvent en dehors de la protection du papier et de la ouate, sont englobés et arrêtés dans leur développement.

La phagocytose est donc, Messieurs, un phénomène à la fois très général et très efficace pour la défense de l'organisme : quand il manque celui-ci succombe. Mais quelle force mystérieuse attire les cellules vers les microbes? Pourquoi les leucocytes qui s'emparent si facilement des microbes chez l'animal vacciné sont-ils incapables de les saisir chez l'animal réceptif? Lorsque, en 1883, M. Metchnikoff a proposé la théorie phagocytaire, il admettait que les cellules allaient vers les microbes, en vertu de la sensibilité tactile qu'elles manifestent vis-à-vis de tous les corps étrangers introduits dans les tissus. Il pensait aussi, que la propriété qu'elles ont de saisir les virus, chez les animaux immunisés, tient à une accoutumance, qui résulte de leur première lutte avec les virus atténués qui ont servi à la vaccination. Aujourd'hui, Messieurs, ces mouvements et ces préférences des leucocytes reçoivent une explication plus facile; on a découvert que les cellules migratrices ont une sensibilité chimique spéciale, une chimiotaxie analogue à celle des

zoospermes des Fougères et des Myxomycètes. Elles sont attirées par certains corps et repoussées par d'autres. MM. Massart et Bordet ont montré que les produits microbiens exercent une chimiotaxie très marquée sur les phagocytes. Les cultures de microbes attirent les leucocytes, et cette propriété attirante appartient aux substances que les microbes elaborent dans les cultures. Ces mêmes produits solubles, qui sont capables de donner l'immunité, ces poisons microbiens dont nous avons parlé, ont sur les phagocytes, les uns une action attractive, les autres une action répulsive.

Lorsqu'un virus est introduit dans le corps, il pullule au lieu d'inoculation et y forme les substances qui attirent les leucocytes ; mais, plus le virus est actif, plus les poisons qu'il prépare sont énergiques ; il arrive que les cellules qui ont pénétré dans ce foyer toxique sont paralysées dans leur action et sont incapables d'englober les microbes qui se répandent sans obstacle. Il y a même des virus très meurtriers, comme celui du choléra des poules, dont la toxine exerce sur les leucocytes une chimiotaxie négative et les écarte du foyer de culture ; aussi, n'y a-t-il jamais de phagocytose dans cette affection.

Il n'en est pas de même chez l'animal vacciné : l'immunité lui a été conférée soit par l'inoculation d'un virus atténué, soit par l'injection de doses ménagées de produits microbiens. Dans les deux cas, il a été soumis à l'action de susbstances solubles que fabriquent les microbes, il a donc pour elles une certaine accoutumance. Quand nous lui donnerons le virus fort, ses phagocytes, attirés au point d'inoculation, et déjà accoutumés aux produits du microbe, engloberont celui-ci avant qu'il ait eu le temps de préparer des doses notables de toxine. C'est donc au début de l'infection que se passe la lutte ; si les leucocytes ne peuvent pas intervenir dans les premiers moments, il sera trop tard ensuite, les microbes auront élaboré assez de poison pour entraver l'action des phagocytes. C'est pourquoi, toute cause qui éloigne les leucocytes du lieu d'inoculation facilite l'infection. L'acide lactique, qui exerce sur les cellules une chimiotaxie négative, permet au virus du charbon symptomatique, auquel on l'ajoute, de se développer dans le corps du lapin, qui, dans les conditions ordinaires, est réfractaire à la maladie. L'étude des propriétés chimiotactiques des divers corps, vis-à-vis des phagocytes, nous conduira certainement à des effets thérapeutiques inattendus. La curieuse influence du sérum des rats, qui injecté à des souris en même temps que des spores charbonneuses, arrête le développement de la maladie, peut être expliquée par la chimiotaxie qu'exerce ce sérum. Il agit d'abord en retardant la germination des spores, ensuite en attirant de nombreux leucocytes qui emprisonnent celles-ci et les empêchent de croître.

L'action des substances microbiennes s'exerce-t-elle directement

sur les leucocytes pour provoquer leur sortie active des vaisseaux? On l'admet généralement, mais M. Bouchard pense que la diapédèse se fait par l'intervention du système nerveux. Chez les animaux réceptifs, les produits microbiens agissent sur les centres nerveux qui resserrent les vaisseaux et empêchent la sortie des leucocytes. S'il en est ainsi, la dilatation vasculaire ne doit pas se produire chez les animaux sensibles, nous voyons cependant que la plupart du temps elle est très marquée.

D'après M. Buchner, les produits qui attirent les phagocytes sont les protéides contenues dans les corps même des microbes, il faut que ceux-ci soient morts pour qu'elles passent dans le milieu environnant et lui communiquent le pouvoir chimiotactique. Les autres substances contenues dans les cultures n'ont pas de propriété attirante. M. Buchner s'en est assuré pour les sels ammoniacaux, la triméthylamine, l'urée, le scatol, la tyrosine. Mais, personne ne prétend que ce soient ces corps qui appellent les leucocytes. Cette faculté appartient aux toxines spécifiques, et M. Buchner ne donne, jusqu'ici, aucun procédé rigoureux pour les séparer des protéides microbiennes. Il ne suffit pas de montrer que les matières protéiques contenues dans les cadavres des microbes attirent les leucocytes, il faudrait encore établir que les microbes vivants n'élaborent point et ne laissent point diffuser de substances capables du même effet.

De tout ce qui précède, nous conclurons donc, Messieurs, que l'immunité acquise est l'accoutumance des phagocytes aux produits microbiens. Il n'est pas nécessaire que cette accoutumance s'étende aux autres cellules de l'organisme. Aussi, voyons-nous des animaux vaccinés, parfaitement réfractaires au virus vivant, être tués par la même dose de toxine qui fait périr un animal neuf. Il y a alors empoisonnement soit des cellules nerveuses, soit de toutes autres cellules du corps, qui ne jouent aucun rôle direct dans la lutte contre le microbe.

La théorie des phagocytes peut-elle aussi nous permettre de comprendre l'immunité naturelle? Celle-ci nous est moins connue, elle dépend souvent de conditions physiques et chimiques simples à constater : telles sont, par exemple, la température du corps, la réaction alcaline ou acide de certains milieux, et chez les végétaux, l'épaisseur plus ou moins grande des membranes cellulaires. Dans bien des cas, cependant, cette immunité trouvera son explication dans la résistance naturelle des leucocytes aux poisons des microbes. De même que la morphine ou la strychnine n'agissent pas sur les cellules nerveuses de certaines espèces animales, de même le poison d'une maladie infectieuse peut être sans action sur les phagocytes d'un animal qui est naturellement réfractaire. Ces cellules sont alors toujours aptes à englober rapidement le virus qui pénètre dans le corps.

La théorie de l'immunité, proposée par M. Metchnikoff, ne nie pas

qu'en dehors de la phagocytose il puisse y avoir d'autres moyens de protection de l'organisme, mais elle affirme que l'action phagocytaire est de tous ces moyens le plus répandu et le plus efficace. Elle nous paraît rendre compte de tous les faits et être éminemment suggestive. La connaissance des poisons microbiens et la vaccination chimique jointes à la découverte de la chimiotaxie ont éclairci ce qu'elle pouvait avoir d'obscur. Bien loin d'être ébranlée par les théories qu'on lui a opposées, elle en tire profit ; n'est-ce pas là, Messieurs, une garantie de sa solidité?

REVUES ET ANALYSES

LA
THÉORIE DES PHAGOCYTES AU CONGRÈS HYGIÉNIQUE DE LONDRES

Lors du Congrès hygiénique international, qui a eu lieu à Vienne en 1887, la question des phagocytes n'a pas été jugée mûre pour la discussion. Ce n'est qu'incidemment qu'elle fut visée par M. Emmerich qui avança que les bacilles du rouget du porc, introduits en grande quantité dans l'organisme des lapins réfractaires, y périssaient déjà au bout d'une heure ou deux sans qu'il y ait eu intervention des phagocytes.

Au Congrès médical international de Berlin en 1890, la théorie des phagocytes n'a pas été non plus discutée directement, et pourtant plusieurs orateurs s'en sont occupés en passant. S'il était permis de considérer les opinions exprimées à ce Congrès comme une sorte de verdict d'un jury international, on devrait penser que la majorité des orateurs se sont prononcés plutôt en faveur de la théorie des phagocytes que contre elle. MM. Bouchard, Cantani, Lister, Virchow ont attribué une valeur plus ou moins importante aux cellules qui luttent contre les microbes; seul, M. Koch a exprimé une opinion tout à fait défavorable à cette manière de voir.

Cependant il faut croire que, malgré ce jugement émanant d'une aussi grande autorité scientifique, la question des phagocytes n'a pas été définitivement enterrée, car les organisateurs de la section bactériologique du congrès hygiénique de Londres ont voulu la soumettre à une discussion dans la séance consacrée à la question de l'immunité en général.

Après le discours de M. Roux (qui est publié en tête de cette revue), M. Buchner, le savant bactériologue de Munich, a formulé les objections principales qu'il fait à la doctrine phagocytaire et a exposé les bases de la théorie, d'après laquelle l'immunité est due surtout aux *alexines*, c'est-à-dire à des substances protectrices qui se trouvent dans les humeurs animales.

Voici les points principaux du résumé donné par M. Buchner [1] lui-même :

En principe, la phagocytose est *regardée comme un phénomène utile, elle est un des multiples moyens de résistance contre les microbes infectieux;* cependant *son importance générale est faible* si on la compare aux autres moyens protecteurs de l'organisme. *Les influences bactéricides* du sang, du sérum de diverses espèces animales, des exsudats, du suc masculaire, etc., *se trouvent, sans aucun doute, en rapport causal avec l'immunité naturelle.* Quant à l'objection principale, que l'on a faite à la théorie bactéricide et qui repose sur le fait que le sang extravasculaire d'un animal est en état de tuer beaucoup plus de bactéries que n'en peut détruire l'animal entier, elle n'a aucune valeur pour M. Buchner, qui y répond par les résultats d'expériences nouvelles qu'il communique dans son discours.

Dans sa critique de la théorie des phagocytes, M. Buchner insiste surtout sur l'importance des expériences dans lesquelles les microbes sont introduits dans l'organisme, enveloppés de papier buvard ou de ouate. M. Buchner admet que dans les cas où les microbes ainsi protégés sont détruits (comme dans les expériences de MM. Petruschky et Pekelharing[2]), les faits parlent contre la théorie des phagocytes, parce que la destruction s'opère uniquement au moyen de la propriété bactéricide des humeurs. Dans d'autres cas, où, au contraire, les microbes, au lieu d'être tués, poussent facilement sous la protection du papier ou de la ouate, le développement des bactéries prouve seulement que la faible quantité des humeurs n'a pas suffi pour tuer un assez grand nombre des microbes introduits. M. Buchner me reproche de n'avoir jamais tenu compte du nombre des bactéries par rapport à la quantité des humeurs bactéricides. Pour démontrer l'importance de cette condition de la façon la plus évidente, M. Buchner a fait plusieurs expérience en collaboration avec MM. Ibener et Roeder, desquelles il ressort clairement, que le pouvoir bactéricide des humeurs est une propriété extrêmement labile qui ne s'exerce que dans des conditions limitées. Ces observateurs ont constaté que lorsqu'on distribue d'une façon égale et régulière une goutte de culture de bactérie dans un certain volume de sérum, ce dernier exerce pleinement son pouvoir bactéricide. Lorsque au contraire on introduit dans le sérum la même quantité des mêmes microbes enveloppés dans un peu de ouate, la propriété bactéricide du sérum ne s'exerce qu'imparfaitement, et la bactérie

1. Le discours complet de M. Buchner a paru dans les publications du Congrès, ainsi que dans les numéros 32 et 33 de *Münchener medic. Wochenschr.*, 1891, et *Hygienische Rundschau*, 1891, n° 16.

2. M. Buchner semble ignorer que ces expériences ont déjà été réfutées par M. Trapeznikoff et par moi-même.

se multiplie avec une grande facilité. Ainsi, par exemple, un tube renfermant du sérum de lapin, dans lequel on introduit un peu de vibrions du choléra régulièrement répartis dans le liquide, reste stérile, tandis qu'un autre, dans lequel on introduit le vibrion du choléra enveloppé par la ouate, se peuple rapidement.

Ces expériences démontrent sans aucun doute que le pouvoir bactéricide des humeurs est très délicat et qu'il faut bien se rendre compte des conditions dans lesquelles il s'exerce. Mais, et c'est surtout ce qu'il nous importe de savoir, ces mêmes expériences prouvent, qu'il n'y a rien de commun entre les conditions réalisées *in vitro*, en répartissant comme on le fait si souvent, un peu de culture prélevée avec une anse de platine dans un grand volume d'un liquide, et les conditions de l'infection naturelle ou artificielle d'un animal vivant. Des deux modes d'opérer employés par M. Buchner et ses collaborateurs, c'est celui où ils introduisent dans le sérum un peu de microbes protégés par une couche de ouate, qui correspond le plus à l'infection de l'organisme. Ces expériences peuvent donc servir pour expliquer ce fait déjà plusieurs fois mentionné que la propriété bactéricide si manifeste *in vitro* peut faire défaut dans l'animal vivant. Or, ce qui nous intéresse avant tout dans la question de l'immunité, c'est justement ce qui se passe dans l'organisme vivant et non dans des tubes à essai, remplis avec du sang ou du sérum [1].

M. Buchner essaye de combattre l'objection basée sur le fait que malgré la propriété bactéricide si manifeste *in vitro* du sérum de lapins vis-à-vis de la bactéridie, ces animaux sont pourtant très sensibles au charbon. Il compare lui-même les bactéridies injectées dans les veines et agglomérées dans des petits vaisseaux aux microbes réunis dans ses expériences sous une enveloppe de ouate et soustraits ainsi à l'influence immédiate du sang. Ce raisonnement prouve encore une fois que les conditions dans l'organisme sont tout à fait autres que celles que l'on réalise dans les expériences courantes sur la propriété bactéricide du sérum, où ce liquide est recueilli dans des tubes et agit sur un petit nombre de bactéridies également réparties dans sa masse.

1. Il est évident que les expériences de M. Buchner et de ses collaborateurs ne réfutent aucunement celles que j'ai faites avec des spores charbonneuses introduites dans l'organisme des animaux réfractaires sous la protection du papier buvard ou de la ouate. Car dans ces exépériences j'introduis non des cultures préparées d'avance, mais des spores sèches qui germent et ne donnent des bactéridies qu'après avoir été humectées par les humeurs des animaux réfractaires. D'ailleurs, il est bien établi, surtout par les expériences récemment publiées par M. Traperznikoff, que les spores charbonneuses germent chez les animaux réfractaires même sans aucune protection. D'un autre côté on sait bien, et M. Buchner l'a lui-même accepté, que les humeurs n'empêchent pas la germination des spores et n'exercent aucun pouvoir bactéricide vis-à-vis des bactéridies issues de ces spores.

Il résulte de tout cela que les nouvelles expériences de M. Buchner, ainsi que ses raisonnements, prouvent avant tout l'inefficacité du pouvoir bactéricide du sérum dans la résistance de l'organisme contre un microbe.

Dans une autre série d'objections, M. Buchner cherche à établir que les leucocytes sont attirés seulement par des substances extraites des cadavres des microbes et que, par conséquent, les microbes doivent déjà avoir été tués par la propriété bactéricide des humeurs avant que les leucocytes se rendent vers l'endroit envahi. Les leucocytes n'interviendraient donc que pour résorber les microbes morts, c'est-à-dire qu'ils joueraient un rôle tout à fait secondaire.

Je ne peux pas entrer ici dans l'analyse détaillée des arguments invoqués par M. Buchner : je me bornerai à citer quelques faits qui prouvent que son opinion n'est point justifiée. 1° La leucocytose, dans les maladies infectieuses, s'observe, comme cela a été démontré surtout par M. V. Limbeck, dès le début, c'est-à-dire lorsque les microbes sont encore vivants. L'augmentation des leucocytes marche de pair avec l'ascension de la température fébrile et cesse justement à l'époque où survient la crise et où un grand nombre de microbes périssent. 2° La leucocytose s'observe dans les cas où les microbes sont vivants dans le sang, comme dans le charbon de beaucoup d'animaux sensibles (Bollinger) et dans la fièvre récurrente de l'homme. 3° Les leucocytes, comme le reconnaît M. Buchner lui-même, englobent des microbes vivants. 4° Des parasites sûrement vivants, comme par exemple certains Nématodes, provoquent autour d'eux une réunion de leucocytes qui les englobent. 5° Lorsque les cadavres des microbes sont très nombreux, mais associés à des produits toxiques, les leucocytes, au lieu d'être attirés, sont au contraire repoussés par ces toxines.

L'ensemble de ces arguments, auxquels on peut en ajouter d'autres encore, prouvent clairement que la phagocytose, pour s'exercer, ne doit nullement être précédée d'une destruction notable des microbes.

Tandis que M. Buchner admet encore une certaine influence des phagocytes dans la lutte de l'organisme contre les agents infectieux, un autre adepte de l'école de Munich, M. Emmerich, va beaucoup plus loin dans son opposition. Il affirme que la sortie des leucocytes et leur rôle phagocytaire représentent une erreur de la nature, parce que les phagocytes, incapables de détruire les microbes, ne font que les disséminer dans le corps. D'après M. Emmerich [1], l'immunité serait due à des poisons bactériens, sécrétés par les cellules fixes tuméfiées. « Le phénomène saillant dans toutes les maladies infectieuses, dit cet auteur, est la tuméfaction trouble et la dégénéres-

1. *Münchener medic. Wochenschr.*, 1891, p. 554.

cence graisseuse. » « Il est très probable que lors de cette modification anormale de la fonction cellulaire, qui se rapporte à tous les genres de tissus de l'organisme, se produisent les corps agissant comme les poisons bactériens et comme cause de l'immunité. » Nous n'avons pas besoin de faire longuement la critique de cette critique et d'insister sur cette théorie, parce que ni l'une ni l'autre ne sont accompagnées de preuves. La base sur laquelle a été appuyée la théorie des poisons bactériens, sécrétés par les cellules, ne s'est point confirmée. Dans sa communication au Congrès de Vienne en 1887, communication que j'ai mentionnée au début de cette revue, M. Emmerich a affirmé que les bacilles du rouget sont complètement détruits déjà au bout de une à deux heures de séjour dans l'organisme des lapins vaccinés. Plus tard il a annoncé que cette destruction se fait même en 25 minutes, malgré les doses très considérables de bacilles injectés. Il est évident qu'une action si rapide ne peut être nullement attribuée à des phagocytes qui exigent pour agir un temps plus long que 25 minutes, qui dépasse une et même deux heures.

Dans le but de me faire une idée personnelle sur ce phénomène, j'ai répété les expériences de M. Emmerich et j'ai trouvé que jamais la destruction des bacilles du rouget, dans le corps des lapins vaccinés, ne se fait aussi vite que l'a affirmé le bactériologiste de Munich. J'ai vu que, même pour détruire des petites quantités de ce microbe, il faut au moins quatre heures, c'est-à-dire un temps tout à fait suffisant pour que les phagocytes puissent remplir leur rôle. Généralement ce temps est encore plus long et dans quelques cas il peut s'étendre jusqu'à plusieurs jours.

M. Emmerich a de nouveau repris ce travail. Mais bien qu'il ait opéré sur des lapins plus réfractaires, et avec des doses de bacilles beaucoup plus petites que dans ses premières expériences, il n'a jamais réussi à obtenir la destruction de ces microbes ni en 25 minutes, ni en une heure, ni en deux heures. A présent M. Emmerich[1] est arrivé à la conclusion que cette destruction se fait en 8 ou tout au plus en 10 heures. Or, cette période de temps est même plus longue que celle qui est indispensable pour que les phagocytes accomplissent leur fonction bactéricide. Il y a des exemples (premier vaccin charbonneux, injecté dans les veines de lapins) où ce phénomène est achevé au bout de trois heures et où cependant ce sont les phagocytes qui agissent.

La théorie de la sécrétion des poisons par des cellules tuméfiées n'est appuyée sur aucun fait bien établi. Son auteur n'a même pas abordé la question de savoir si dans les cas où les microbes sont détruits dans l'organisme réfractaire, sans qu'il se développe une maladie infectieuse,

1. *Archiv für Hygiene*, 1891.

cette tuméfaction trouble se produit. Chez les animaux transparents, comme les Daphnies, on voit bien que l'acte de la destruction des microbes par les phagocytes n'est nullement accompagné d'une tuméfaction de cellules quelconques.

Quant à la propriété des phagocytes de disséminer les bactéries vivantes, elle est manifeste dans quelques cas, comme dans la tuberculose, où cependant la fonction bactéricide des phagocytes est bien démontrée. Mais ces exceptions sont rares et la règle est que les phagocytes détruisent les microbes englobés ou empêchent leur développement. D'ailleurs on a déjà si souvent montré qu'elles n'atteignaient en rien la théorie, qu'il n'est pas besoin de les discuter longuement de nouveau.

Les expériences de MM. Emmerich, Mastbaum et Fawitzky sur la prévention et la guérison du rouget et de la pneumonie n'ont aucun rapport direct avec la question qui nous préoccupe. Il s'agit ici d'un procédé de vaccination et de traitement par des produits microbiens préparés dans l'organisme d'animaux réfractaires. Ces expériences rentrent donc dans la catégorie des recherches sur la vaccination chimique, qui, comme on le sait bien, ne se trouve nullement en contradiction avec la théorie des phagocytes.

Dans un travail « sur la désinfection dans l'organisme vivant », présenté par M. Behring[1] au Congrès de Londres et lu à la séance consacrée à la désinfection en général, cet auteur attaque vivement la théorie cellulaire de l'immunité, à laquelle il substitue une doctrine humorale.

Après avoir exposé les faits en faveur de la théorie d'une propriété toxinicide du sérum, M. Behring aborde la question du pouvoir bactéricide des humeurs, et il ajoute : « Les propriétés *bactéricides* de l'organisme vivant qui, autrefois, ont aussi été attribuées à des forces cellulaires, sont actuellement expliquées par la grande majorité des observateurs de la même façon que je l'ai fait il y a déjà trois ans pour le charbon des rats, c'est-à-dire par l'admission d'une propriété du sang dépourvu de cellules. » Dans sa réponse à l'exposé de M. Behring, réponse faite à la séance du Congrès, M. Roux a déjà insisté sur le fait que les phénomènes bactéricides du sang et du sérum de rats n'ont rien à faire avec l'immunité dont le rat blanc est dépourvu dans la grande majorité des cas. Les expériences que nous avons faites, M. Roux et moi, et qui sont publiées dans ce numéro des *Annales*, le prouvent suffisamment. En même temps ces expériences démontrent le rôle des phagocytes dans un exemple qui a été si souvent invoqué contre la théorie des phagocytes.

1. Publication du Congrès international de Londres, 1891.

Un autre cas de propriété bactéricide qui a été découvert par M. Behring (en collaboration avec M. Nissen), et qui est certainement le plus remarquable de ceux qui sont cités, a été analysé dans l'article sur le *Vibrio Metchnikowii*, publié également dans ce numéro des *Annales*. Je n'y reviendrai pas.

Pour ce qui concerne la propriété toxinicide et son rôle dans les phénomènes de l'immunité, je n'ai qu'à me reporter aux arguments exposés par M. Roux dans son discours sur l'Immunité, et qui se trouvent aussi dans cette Revue.

M. Behring se plaint que la théorie cellulaire empêche les progrès de la thérapie et il ajoute : Lorsqu'il s'agit de savoir comment utiliser les cellules vivantes, pour guérir les maladies et comment diriger leur action pour le rétablissement de l'homme malade, la réponse est fort embarrassée.

Je m'étonne que M. Behring, qui est un savant allemand, puisse objecter à une théorie son inefficacité pratique. En Allemagne, où l'esprit scientifique est très développé, on sait bien que la science pure cherche la vérité sans se préoccuper des conséquences pratiques. Celles-ci sont l'objet de la science appliquée qui prend son bien partout où elle le trouve. Ainsi, le plus souvent, la thérapie ne s'est conformée avec aucune théorie, et c'est par voie purement empirique qu'elle est arrivée à la découverte de l'écorce de quinquina, de la digitale, etc. Dans un domaine qui nous touche de plus près, nous avons vu la découverte des vaccinations préventives contre la variole, le charbon et de tant d'autres maladies être faites sans aucune théorie de l'immunité. Bien plus, la découverte si salutaire des vaccinations antirabiques a été réalisée sans la connaissance du microbe de la rage.

D'ailleurs, le reproche adressé par M. Behring à la théorie des phagocytes n'est point fondé. Déjà M. Hess a démontré, en 1887, dans un travail expérimental, que l'application de la chaleur à l'œil inoculé par le staphylocoque guérit la maladie grâce à la suractivité donnée aux phagocytes. Chaque jour aussi il devient de plus en plus probable que dans les cas où il y a amélioration après l'emploi de la tuberculine, c'est la résistance des cellules tuberculeuses, et non leur nécrose, qui en est la cause. Or il est démontré que les cellules tuberculeuses sont de véritables phagocytes.

Lorsqu'on connaîtra les influences physiques et chimiques qui exagèrent l'activité des phagocytes, ainsi que les substances qui agissent dans la digestion intracellulaire, on trouvera des moyens pour faire triompher ces cellules dans la lutte de l'organisme contre les microbes.

Si, jusqu'à présent, ce côté n'a pas été encore abordé, c'est surtout grâce à l'opposition opiniâtre contre la théorie des phagocytes,

opposition qui, en empêchant son extension scientifique, gêne aussi son application pratique,

M. Behring trouve que « la théorie des phagocytes s'appuie sur des forces mystérieuses de la cellule vivante ». Et cependant, cette théorie n'invoque que des facteurs qui sont généralement répandus dans le monde vivant : sensibilité et mobilité du protoplasma et digestion intracellulaire. Ce sont certainement des phénomènes encore très incomplètement connus, mais qui ne présentent aucun caractère mystérieux. Dans sa réponse à M. Behring, M. Roux a dit : « C'est une habitude d'accuser la théorie phagocytaire de mysticisme, mais en dernière analyse elle ne fait intervenir que des actions chimiques. Est-ce que la chimiotaxie ne s'exerce pas au moyen de substances chimiques? Est-ce que la digestion intracellulaire des microbes n'est pas une action chimique ? Il s'agit ici d'une chimie délicate à étudier, comme toute la chimie des êtres vivants : il ne faut pas croire qu'on l'éclaircira, en se bornant à examiner, *in vitro*, les humeurs plus ou moins modifiées de l'organisme ».

Les travaux biologiques montrent le chemin que doivent suivre les chimistes. L'analyse microscopique démontre la grande importance des phagocytes dans la lutte de l'organisme contre les microbes, mais il est réservé à la chimie d'approfondir la question. Il faut faire la chimie des cellules en général et celle des phagocytes en particulier. Déjà un jeune savant de beaucoup de talent, M. Hankin, a arboré son pavillon sur ce nouveau terrain.

Il cherche les substances renfermées dans les phagocytes et tend à prouver qu'il y a parmi celles-ci des albumoses bactéricides. Il les désigne sous le nom de myxosocines et de myxophylaxines. Ces recherches ne sont que commencées, de sorte qu'on ne peut pas encore se prononcer définitivement sur leur valeur, mais la voie ouverte est certainement féconde. Il est certain que la destruction des bactéries dans les liquides n'a le plus souvent qu'une importance tout à fait secondaire. On a vu déjà les meilleurs milieux de culture, comme le bouillon et le lait, exercer une influence bactéricide (*Hafkine, Fokker, Freudenreich, V. Christmas*) qui est certainement étrangère à l'action des socines ; on a constaté souvent aussi la propriété bactéricide de l'humeur aqueuse, liquide qui ne renferme pas de substances extraites des cellules. Mais il est évident que le sérum, humeur le plus souvent étudiée, ne peut être identifié avec le plasma sanguin. M. Hankin, qui insiste sur cette différence, a certainement raison contre les savants qui l'ignorent toujours dans leurs travaux.

Dans cette revue je n'ai tenu compte que des communications au Congrès, qui ont été faites ou publiées d'une façon plus ou moins complète. Il y en a d'autres encore où les auteurs ont exprimé leurs opinions

sans avoir eu le temps d'exposer toute leur argumentation. Ainsi, M. Klein a rapporté des expériences intéressantes dans lesquelles il a vu que le chloroforme facilite le développement du charbon chez les grenouilles et les rats. M. Klein pense qu'il s'agit ici d'une action sur les humeurs de ces animaux, malgré les données de MM. Massart et Bordet sur le pouvoir anesthésiant de cette substance vis-à-vis des leucocytes. Sous l'action du chloroforme ces cellules sont paralysées et gênées dans leur fonction phagocytaire. La discussion de cette question ne peut être soulevée qu'après la publication du mémoire complet de M. Klein. E. M.

Dobroslawine. Le choléra et l'alimentation des eaux dans la ville de Péterhof, *Archiv für Hygiene*, F. X., 1.

M. Dobroslawine, partisan de la théorie épidémiologique de Pettenkofer, apporte dans ce travail un fait nouveau devant servir pour l'étiologie du choléra.

En 1837, Péterhof, petite ville aux environs de Saint-Pétersbourg, se fit remarquer par une immunité parfaite contre le choléra, qui sévissait alors dans presque toute l'étendue de la contrée environnante. Le fait fut attribué à l'application rigoureuse des mesures de quarantaine, et on ne lui attacha aucune importance particulière. Depuis, quatre fois le choléra fit son apparition dans la capitale et ses environs, à savoir en 1848, 1854, 1866 et dans les années 1870-72; deux de ces épidémies, celles de 1848 et 1854, ont atteint Péterhof; les deux autres, dont une très prolongée, l'ont parfaitement épargnée.

La ville de Péterhof est située au bord du golfe de Finlande, assise sur deux terrasses, une de 60 pieds de hauteur, et une autre presque au niveau de la mer, remarquable par de beaux jardins et de nombreuses fontaines qui en font un séjour recherché pour les habitants de la capitale.

La ville reçoit toutes ses eaux de loin, par les défilés des vallées qui s'étendent derrière elle, au sud de ses terrasses. Pierre le Grand, le fondateur de la ville, a eu soin de réunir une série de sources lointaines, celles de Zaborod, de Gladine, de Lapir, et amena leurs eaux, par un conduit magistral, jusqu'à la petite ville au bord de la mer. Ces eaux, après avoir alimenté la ville, s'écoulent au bas de ses terrasses, en formant une série de petits étangs qui, tous, communiquent entre eux par des voies souterraines ou superficielles.

Les recherches faites sur les formations géologiques du terrain, montrent, à peu de profondeur, l'existence d'une couche imperméable, constituée par un lit continu d'argile bleue. Les eaux qui s'introduisent dans le sol, s'infiltrant à travers les terrains meubles, descendent jusqu'à l'assise d'argile et y forment une nappe qui communique et alimente les étangs dont il vient d'être question. L'analyse chimique prouve l'identité de ces eaux.

La ville de Péterhof posséderait donc une couche permanente

d'eaux souterraines, très près de son niveau, qui, dans les idées de Petterkofer, maintiendrait constamment humectées et imbibées les couches superficielles du sol et les rendrait impropres à la production de ces miasmes dont il était tant question dans le temps passé. Reste à trouver une explication pour les cas exceptionnels, qui paraissent en contradiction avec les conditions physiques du pays.

Les recherches que l'auteur entreprit à cet effet dans les archives de la ville, lui ont fait découvrir ce qui suit.

En 1837, les sources dont profite Péterhof tombèrent entre les mains d'un particulier qui ne tarda pas à user de ses droits et à se mettre en controverse avec la municipalité. Afin de faire valoir les intérêts de la ville, on prit la voie des tribunaux; mais, mécontent de la direction qu'avait prise le procès, et appréciant bien l'importance de ses sources, le propriétaire détourna à plusieurs reprises la canalisation des eaux alimentaires. Il est évident que le sol de la ville dut être immédiatement appauvri de ses eaux et la nappe souterraine dut baisser et laisser sèches les couches superficielles. Il se trouve précisément qu'un de ces caprices du propriétaire est consigné justement au mois de mai 1848 et un autre au même mois de 1854, aux moments mêmes où l'épidémie sévissait dans la contrée. On se vit dans la nécessité de s'émanciper d'une façon quelconque de ce despotisme, et on avait déjà fait le projet d'une nouvelle canalisation indépendante de l'ancienne, quand la mort enleva l'auteur de ces tracasseries, et l'affaire a pu être réglée à la satisfaction des autorités de la ville. Depuis lors l'état des choses n'a jamais été troublé; l'alimentation du sol se rétablit définitivement d'une façon régulière, et les deux épidémies qui suivirent ont trouvé la ville parfaitement protégée par les dispositions physiques esquissées plus haut. W. S.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte de rage pendant le traitement.

Milet (Henri), 11 ans, demeurant à Montreuil-sous-Bois (Seine). — Mordu le 18 juin 1891 par un chien que le propriétaire a tué et fait disparaître le même jour.

Milet porte sur la joue gauche, partie moyenne, une morsure forte, pénétrante, ayant beaucoup saigné, Une autre forte morsure lui a traversé la lèvre inférieure.

Il se présente à l'Institut Pasteur le 23 juin, et reçoit ce jour-là les deux premières inoculations. Depuis cette époque, il cesse de venir à l'Institut Pasteur jusqu'au 1er juillet; à partir de cette époque et jusqu'au 16 juillet, il suit régulièrement le traitement, qu'il interrompt alors une nouvelle fois.

Le 18 juillet, dans l'après-midi, il présente des symptômes de rage (hydrophobie, aérophobie). On le fait entrer à l'hopital des enfants, où il meurt de rage le 20 juillet dans la matinée.

Un lapin et un cobaye, trépanés avec le bulbe de Milet, ont pris la rage après 18 jours d'incubation.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — JUILLET 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	2	5	»	2	11	»	»	1
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	3		»	9		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	2	»	»	6	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	3	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	3	11	»	22	42	»	5	20
Morsures aux mains — multiples	»	8		»	20		»	15	
Cautérisations efficaces	1	»	»	3	»	»	2	»	»
— *inefficaces*	5	»	»	13	»	»	10	»	»
Pas de cautérisation	5	»	»	26	»	»	8	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	4	9	»	12	37	»	7	14
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	5		»	25		»	7	
Cautérisations efficaces		»	»	3	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	5	»	»	19	»	»	6	»	»
Pas de cautérisation	4	»	»	15	»	»	7	»	»
Habits déchirés	7	»	»	34	»	»	13	»	»
Morsures à nu	2	»	»	3	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	7	7		1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	4	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	3	»	»	»	»	»
Habits déchirés	1	»	»	3	»	»	»	»	»
Morsures à nu	1	»	»	7	»	»	1	»	»
Totaux. Français et Algériens		26	26		14	97		4	36
Totaux. Etrangers					83			32	
	A			B			C		
TOTAL GÉNÉRAL				159					

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 146 fois; chats, 12 fois; cheval, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

5me ANNÉE. SEPTEMBRE 1891. N° 9.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA FIÈVRE RÉCURRENTE

PAR M. J. SOUDAKEWITCH,

Prosecteur d'anatomie pathologique à l'Université de Kieff.

(Avec les planches XIV, XV, XVI et XVII.)

Les progrès de la bactériologie, qui ont éclairé tant de faits importants de la pathologie des maladies infectieuses, n'ont jeté, malheureusement, qu'un faible reflet sur la fièvre récurrente.

La rareté comparative d'épidémies de cette maladie dans l'Europe occidentale d'une part; de l'autre, l'impossibilité de cultiver son microbe, l'immunité dont jouissent vis-à-vis de lui les animaux communs des laboratoires, et enfin l'imperfection de ses méthodes de coloration dans les tissus, voilà les causes qui ont arrêté le développement de nos connaissances sur la fièvre récurrente.

Le spirille de cette maladie a été décrit pour la première fois par M. Obermeier, en 1873. Toute une série d'observations cliniques a prouvé la présence régulière des spirilles dans le sang des malades pendant l'accès, et leur disparition complète pendant l'apyrexie.

Comment disparaissent-ils? Périssent-ils complètement dans le sang même, ou, ainsi que d'autres microbes, se réfugient-ils dans divers organes? C'est en vain que nous chercherions une

réponse à ces questions dans les recherches pathologo-anatomiques des décades 70 et 80. Ces recherches contiennent la description des modifications observées dans les divers organes, à l'autopsie des individus morts dans les différents stades de la maladie, mais elles ne disent rien ni sur le sort des spirilles, ni sur le rôle qu'ils jouent dans les modifications observées.

Il est vrai que déjà, en 1874, M. Ponfick, se basant d'un côté sur les expériences faites par lui pour étudier le sort de différentes substances étrangères, introduites dans le sang, et, d'un autre côté, s'appuyant sur l'étude du tableau pathologo-anatomique de la fièvre récurrente, avait émis l'hypothèse que « les organismes filiformes », décrits par Obermeier, doivent se trouver dans les cellules de la pulpe de la rate. Mais M. Ponfick ne parvint pas à le prouver, et il attribua l'échec de ses multiples efforts à la faible dimension des spirilles et au manque de réactifs spécifiques.

Les auteurs ultérieurs ne font que reproduire la supposition, très vraie et bien fondée, du reste, de M. Ponfick (Heidenreich, Litten).

C'est en 1887 que la réponse aux questions posées ci-dessus fut donnée, pour la première fois, par M. Metchnikoff, qui profita de la découverte de Carter et de Koch sur la réceptivité des singes vis-à-vis de la fièvre récurrente pour faire des recherches sur six de ces animaux.

En sacrifiant ces singes à diverses phases de la maladie, et en étudiant leur sang et des préparations étalées des tissus de divers organes, M. Metchnikoff parvint à démontrer que l'on n'observe pas de phagocytose ni de destruction des spirilles dans le sang, où ces parasites se trouvent pendant l'accès; il démontra qu'avant la crise les spirilles, qui sont parfaitement vivants, se rassemblent tous dans la rate et y sont englobés par les microphages, ou leucocytes à noyaux lobés.

L'examen du foie, des reins, de la moelle des os, et des glandes lymphatiques y démontre toujours l'absence de spirilles.

Le passage des spirilles du sang dans la rate indique que la lutte est engagée entre cette dernière et les spirilles. Ce fait m'a poussé à profiter de l'épidémie de fièvre récurrente qui a sévi à Kieff, durant l'été de 1890, pour étudier le sort des spirilles dans les animaux dératés.

Je me mis à l'étude de cette question d'autant plus volontiers que, quoique personne n'eût repris les expériences de Metchnikoff, on n'en avait pas moins fait de nombreuses critiques dans les journaux scientifiques, les dissertations et même dans la presse générale.

J'avais à ma disposition 6 exemplaires de singes de l'espèce *Cercocebus fuliginosus* (Geoffr.).

Je commençai mes observations par l'étude de la marche de la maladie chez les singes non dératés. Je fis quatre expériences dans ce but.

L'injection du sang typhique (récurrent) était faite sous la peau, n'importe à quel endroit du corps, le plus souvent sur le dos, près de la queue.

Le sang était recueilli chez les malades à l'aide de pipettes en verre flambées, dont je chauffais le bout élargi et fermé ; par refroidissement, le sang remontait en quantité suffisante. On obtenait le même résultat à l'aide de sangsues. Quand elles avaient sucé le sang, je leur mettais sur le bout postérieur du corps un petit cristal de chlorure de sodium, à la suite de quoi elles laissaient écouler le sang que j'injectais alors au singe.

Les températures étaient mesurées dans le rectum de 3 à 6 fois par jour, et plus souvent encore, quand c'était nécessaire. La période d'incubation était généralement d'une durée de 3 jours, mais elle a été dans un cas, de 2 jours, et dans un autre de 6. — Deux des singes furent inoculés deux fois ; chez l'un d'eux la première maladie passa inaperçue, l'autre fut malade les deux fois et sa fièvre était très marquée. Une fois la maladie dura 4 jours et l'autre 2. L'intervalle des injections était de 15 jours. La durée des accès variait entre 2 et 4 jours. Je ne sais pas si mes singes avaient des rechutes. Ce fait ne m'intéressait pas, et je m'en suis tenu aux assertions de Carter, Koch et Metchnikoff, qui n'ont toujours observé qu'un seul accès ; après l'apyrexie il ne survenait qu'une légère et courte élévation de température, et le sang ne contenait plus de spirilles.

Le deuxième jour après l'inoculation, je faisais des préparations microscopiques avec le sang, et je les colorais d'après la méthode Günther. Ordinairement c'était dans la troisième journée que l'on parvenait à trouver 1-2 spirilles ; à partir de ce jour leur quantité augmentait rapidement ; la température

s'élevait jusqu'à 40, 41 et même 42°; le 2e ou 3e jour après la première constatation des spirilles, et une fois dépassé le maximum de température, les parasites commençaient à disparaître rapidement du sang, et la crise survenait (voir les tracés 1, 2, 3 et 4).

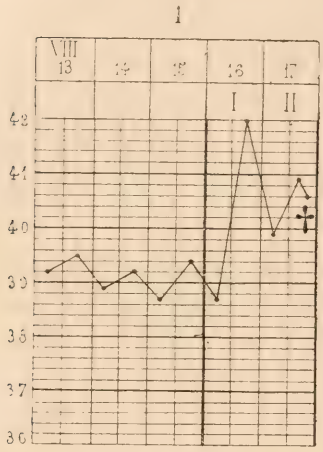


Fig. 1. — Tracé 1.

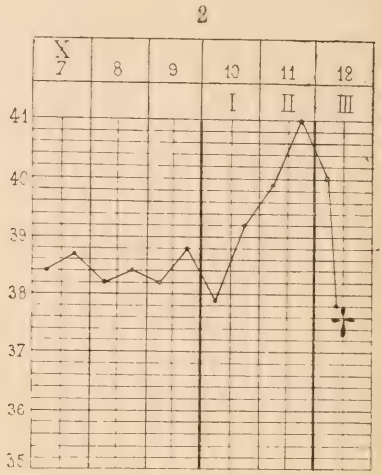


Fig. 2. — Tracé 2.

La maladie n'avait qu'une faible influence sur l'état général des singes : ils devenaient lents, tristes et avaient moins d'appétit.

Trois des singes malades furent sacrifiés par le chloroforme, à des divers stades de la maladie: le premier au 2e jour de l'accès avec la température 40° 6 (tracé 1) : le second, au 3e jour de la maladie avec la température de 37° 8 (tracé 2), et le 3e à peu près 10 heures après la crise, avec la température de 38° 2.

Dans chacun de ces trois cas, on examinait à l'autopsie le sang des divers grands vaisseaux sur des préparations fraîches et colorées (d'après Günther) et les humeurs des divers organes, du foie, des reins, des ganglions lymphatiques, de la moelle des os, de la rate (coloration par le bleu de méthylène phéniqué de Kühne).

Des morceaux des différents organes, destinés pour des coupes, étaient conservés dans les liquides de Müller et Flemming, et dans l'alcool d'après les règles communes.

Chez le premier singe on ne trouva des spirilles que dans le

sang; ceux qu'on trouvait en quantité insignifiante dans les préparations faites avec le suc des organes provenaient évidemment du sang resté dans la préparation.

Je réussis à voir dans le sang, près de la veine cave inférieure, l'englobement des spirilles par les leucocytes à noyaux lobés. Je trouvai, à la suite d'un examen attentif sur des préparations fixées avec l'acide osmique à $\frac{1}{2}$ 0 0, et colorées par le violet de gentiane aqueux, de 10 à 15 leucocytes renfermant des spirilles. La quantité des spirilles renfermés dans une cellule oscillait entre 1, 3, et même 6; ils étaient tantôt isolés, tantôt entrelacés en formant de petits amas.

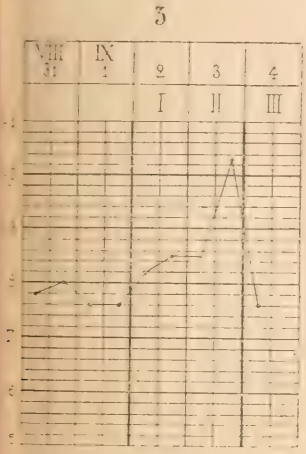


Fig. 3. — Tracé 3.

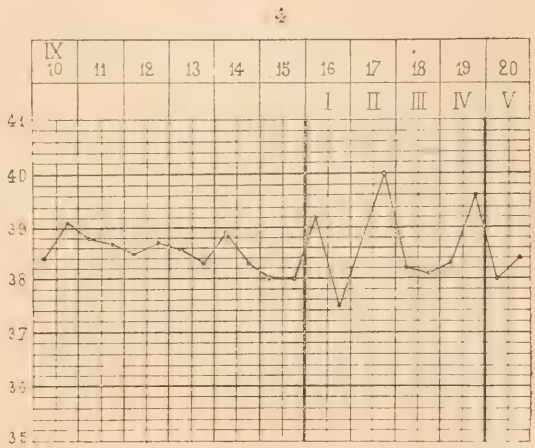


Fig. 4. — Tracé 4.

Les spirilles contenus dans les cellules n'étaient pas toujours semblables entre eux : il y en avait qui étaient très faiblement colorés, presque imperceptibles. Les uns conservaient leurs ondulations, tandis que les autres avaient l'aspect d'un fil long et droit; on observait des interruptions le long du fil, qui était divisé en 2, 3 tronçons; au bout de certains fils, et quelques fois aussi dans leur parcours, on observait des petites granulations fortement colorées. Dans quelques cellules, ces granulations étaient disposées hors des spirilles, et libres dans le protoplasme tantôt isolément, tantôt en petits amas. On trouvait de rares leucocytes, contenant des spirilles contournés en vrille, qui se dessinaient nettement dans le protoplasme cellulaire

environnant. Enfin, je dois encore indiquer des espaces clairs, tantôt ronds, tantôt ovales, délimités dans le protoplasme des leucocytes. Quelques-uns d'entre eux correspondaient à l'endroit occupé par les spirilles (vacuoles)? (Voir Planche XVI, fig. 8.)

Il n'était pas douteux que les spirilles englobés par les leucocytes y subissaient des modifications régressives.

La netteté de ces constatations me poussa à étudier, à ce point de vue, le sang de l'homme malade de la fièvre récurrente; mais je ne réussis à rien observer de semblable, malgré l'emploi des mêmes méthodes techniques.

L'examen du sang des deux autres singes y démontra l'absence de spirilles; chez l'un d'eux (le 2e) ces derniers étaient contenus en grande quantité dans la rate et englobés dans ses microphages; chez l'autre je ne parvins à les voir ni dans le sang, ni dans la rate, quoique de nombreux examens du sang de ce même singe avant la crise en eussent fait découvrir un assez gand nombre.

On trouvait quelquefois dans les préparations de la rate des débris de spirilles, pour ainsi dire, hors des cellules, ou des amas de granulations dans les leucocytes; mais de tels tableaux étaient rares et peu probants.

Il fallait donc admettre que les spirilles, déjà 10 heures après leur disparition du sang, étaient si complètement détruits par les phagocytes de la rate, qu'il n'en restait presque aucune trace.

Je me mis alors à l'étude des organes durcis des trois singes; mon attention était surtout portée sur la coloration des spirilles dans les coupes.

Comme je l'ai dit plus haut, nous n'avons pas jusqu'à présent de bonnes méthodes de coloration des spirilles dans les tissus.

Pourtant, en 1881, M. Koch avait obtenu leur coloration à l'aide de couleurs brunes d'aniline; mais, d'après ce qu'il dit lui-même, « ces colorations ne sont pas assez intenses, de sorte que la démonstration des spirilles dans les coupes est une tâche des moins faciles ».

Pour prouver cependant la possibilité d'une coloration des spirilles dans les tissus, possibilité niée par beaucoup d'auteurs, M. Koch a joint à son article deux photogrammes, représentant

des coupes du cerveau d'un singe, inoculé de la fièvre récurrente et sacrifié au maximum de l'accès. Autant qu'on peut le voir par ces figures, la coloration des spirilles laisse encore beaucoup à désirer.

De tous les traités de bactériologie, ce n'est que dans celui de M. Hueppe que j'ai pu trouver une indication, peu précise pourtant, sur la coloration en question : «... les spirilles de la fièvre récurrente peuvent être bien décelés par les couleurs bleues de méthylène; il est cependant indispensable d'éviter complètement les acides pour les différenciations. »

Dans mon travail, je me suis adressé tout d'abord aux couleurs brunes (brun de Bismark, Vésuvine), mais je n'obtins que des résultats défavorables; je fus longtemps poursuivi par les mêmes échecs en essayant diverses méthodes de colorations, qui échouaient toujours quand je voulais différencier les spirilles. Après de nombreuses tentatives, je me suis enfin arrêté à une méthode qui est dans une certaine mesure une modification de celle de Kuhne et que voici :

Il faut éviter autant que possible l'inclusion des organes dans la celloïdine, la paraffine ou dans la gomme; j'ai obtenu les meilleurs résultats sur les coupes, faites par le microtome de Reichert, avec des organes durcis dans le liquide de Müller et ensuite dans l'alcool.

Les coupes étaient d'abord colorées dans du carmin borique, puis différenciées dans le liquide décolorant de Orth (30 parties d'eau, 70 parties d'alcool et 1 partie d'acide chlorhydrique) ensuite lavées à l'eau et laissées 12 à 24 heures dans une solution de bleu de méthylène, obtenue en ajoutant dans un verre de montre rempli d'eau distillée, 3 à 4 gouttes d'une solution de bleu de méthylène phéniqué (le bleu de méthylène sec était dissout dans de l'eau phéniquée à 5 0/0). En sortant de ce liquide, les coupes étaient plongées une seconde dans de l'alcool à 95°, coloré par du bleu de méthylène; ensuite dans de l'huile d'aniline colorée, puis dans de l'huile incolore; enfin elles étaient lavées dans de l'essence de cèdre et montées au baume de Canada.

La coloration des spirilles était beaucoup plus intense dans les coupes colorées antérieurement par le carmin, de sorte que ce dernier servait en même temps de mordant.

Cette méthode ne saurait être regardée comme tout à fait suffisante, parce que tous les éléments de la préparation étaient colorés d'une seule teinte. Néanmoins les spirilles étaient assez colorés pour qu'on pût les voir sans trop de difficulté (à l'aide du système apochromatique de Hartnak — 2,0 mm, et le 3e ou 4e oculaire), et se faire une idée assez exacte de leur quantité et de leur localisation. Malgré de nombreuses tentatives, je ne parvins pas à décolorer les éléments des tissus et à obtenir une coloration double.

En colorant de la manière décrite les coupes de la rate, du foie, de la moelle des os (celle-ci dans de la celloïdine), du cerveau, des poumons et des ganglions du premier singe, je trouvais toujours des spirilles dans les vaisseaux sanguins; dans aucun des organes on n'en trouva au dehors de ceux-ci. On ne constata non plus aucune trace de modification dans le tissu interstitiel des organes. La tendance des parasites à s'accoler assez étroitement aux parois des vaisseaux, et à former des enchevêtrements plus ou moins grands qui, quelquefois, bouchent complètement le vaisseau, suffisait à expliquer l'apparition de thrombus uniquement dus aux parasites et le développement d'infarctus.

Chez le deuxième singe, c'est dans la rate seule que l'on trouva des spirilles. Sur les coupes on pouvait voir qu'ils se rassemblaient exclusivement à l'intérieur des corps de Malpighi; il n'y avait point de spirilles libres — ils étaient tous contenus dans l'intérieur des microphages. Il était beaucoup plus difficile d'observer les modifications subies par les parasites à l'intérieur des cellules sur les coupes que sur les préparations étalées.

Dans tous les cas, ici aussi on pouvait souvent constater la disparition des ondulations, et voir les granulations colorées, disposées tantôt aux bouts, tantôt sur le parcours des spirilles.

Les organes du troisième singe ne contenaient pas de spirilles ; je ne veux pas dire qu'il n'y en avait pas de traces dans la rate ; mais les tableaux observés, sans stades intermédiaires, n'étaient pas probants.

M'étant ainsi convaincu de la marche typique de la fièvre récurrente chez les singes du genre donné, et du rôle important et exclusif réservé à la rate, dans l'évolution de cette mala-

die, je pouvais me mettre à l'étude du point principal, à celle de la maladie chez les singes dératés.

J'ai fait deux expériences sur les singes dératés ; elles ont eu des résultats différents, mais en même temps, et heureusement, tellement précis, que je crois pouvoir m'appuyer sur elles, malgré leur diversité, pour en tirer des conclusions déterminées. Dans les deux expériences, l'extirpation de la rate fut faite avec toutes les règles antiseptiques, par mon collègue estimé M. P. Sapiégko. Je lui présente mes remerciements sincères pour son concours précieux.

Ire EXPÉRIENCE.

Le 2 août, un singe mâle, bien portant, fut dératé. Il fut malade pendant les deux premiers jours après l'opération ; il restait sans bouger, le dos voûté, ne mangeant pas, et ayant parfois le hoquet. Il commença à manger le troisième jour, et le cinquième se rétablit complètement, redevint vif et gai. Sa température oscillait entre 37 et 38°. La plaie avait guéri par première intention.

Vingt-quatre jours après on lui inocula, ainsi qu'à un autre singe témoin, 0,5cc de sang, contenant des spirilles vivants, retiré d'un malade pendant le deuxième jour de l'accès. L'inoculation fut faite sous la peau, dans l'aîne gauche.

L'incubation fut, chez les deux singes, d'une durée de trois jours; les spirilles apparurent dans le sang du témoin pendant le quatrième jour, et sa température s'éleva. L'accès dura pendant trois jours, accompagné de températures relativement basses : le soir du troisième jour de l'accès, la température était de 38° 3, le lendemain matin de 36° 7, et les spirilles disparurent : l'animal était rétabli.

Chez le singe dératé, les spirilles furent constatés aussi le quatrième jour, mais sa température était très basse, — 34° 8 le matin et 37° 2 le soir, — et il était évidemment malade. Les jours suivants, la température présentait de même des oscillations brusques (tracé 5).

Le cinquième jour, la quantité des spirilles augmenta un peu,

le singe n'avait pas d'appétit. Les six, sept et huitième jours, la quantité des spirilles avait augmenté visiblement; le singe était très malade, ne mangeait plus du tout, et restait étendu sur le ventre. Enfin le huitième jour, à 2 heures de l'après-midi, il succomba, ayant toujours une température aussi basse — 34°7. L'autopsie fut immédiatement faite.

Mon étonnement fut grand en constatant que le sang, pris dans la veine cave inférieure, présentait pour ainsi dire un enchevêtrement de spirilles ; on peut dire sans exagération que leur quantité était égale à celle des globules sanguins, sinon

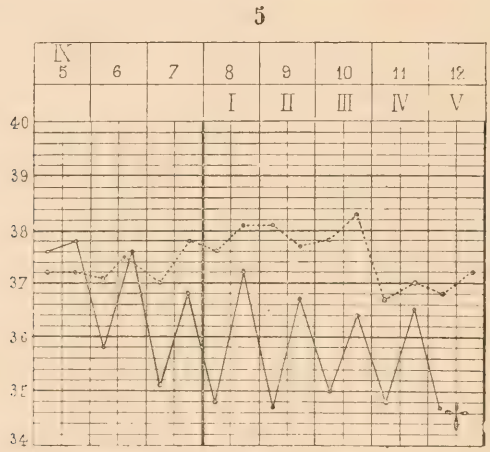


Fig. 5. — Tracé 5.

plus grande encore ; les spirilles étaient disposés tantôt isolément, tantôt parallèlement en forme de flagelles, tantôt, et c'était le cas le plus fréquent, en amas étoilés, chaque amas étant composé d'une masse énorme de spirilles (près de 100) ; ceux-ci étaient tous unis par un de leurs bouts, formant ainsi le centre de l'étoile, et ayant les autres bouts libres et rayonnant à la périphérie (voir la planche XIV, fig. 1). Déjà en 1877 M. Heidenreich avait observé de pareilles étoiles chez deux malades ; il avait remarqué que la condition indispensable de leur formation était l'état de circulation ralentie du sang ; voilà pourquoi ces étoiles se forment facilement en dehors de l'organisme ; quant aux deux malades chez lesquels elles s'étaient formées, à ce qu'il croit, dans l'organisme même, ce fait peut être

expliqué par la gravité de la maladie, accompagnée d'une circulation affaiblie : pouls faible et accéléré, extrémités froides, phénomènes de cyanose, etc.

A l'autopsie du singe on constata ce qui suit :

Il y a un enfoncement assez profond, du diamètre de 0,7 centimètres, dans l'os pariétal droit (de provenance traumatique?). La partie intérieure de l'os, correspondant à l'enfoncement, n'est pas soudée à la dure-mère; le cerveau n'est pas modifié; les poumons sont intacts; le cœur n'est pas contracté, ses cavités sont remplies de coagulations en partie sanguines, et en partie fibrineuses. Un corps arrondi, de la dimension de 16 millimètres en diamètre, d'une couleur rouge mat, est disposé dans l'hypocondre gauche, derrière l'estomac; il est soudé à la paroi postérieure de l'estomac par un épais tissu cicatriciel qui se répand en partie sur le diaphragme.

La coupe de ce corps présente un fond d'un rouge intense foncé, sur lequel sont disséminés, en quantité, de petits nodules jaunes, blanchâtres, de la dimension depuis un point jusqu'à une tête d'épingle. Sur une des coupes de ce corps, on reconnaît un cône de forme assez régulière, de couleur cerise foncé, dont la base est renversée du côté de la capsule; le centre du cône est un peu plus pâle que sa périphérie; il a 3 centimètres depuis sa base jusqu'au sommet. Les reins sont modérément remplis de sang, la couche corticale est légèrement trouble. Le canal digestif est vide et ne présente pas de modifications. Le foie est modérément rempli de sang.

La moelle des fémurs et des tibias est d'une couleur rose pâle. Les divers ganglions ne sont pas hypertrophiés. Sans aucun doute le corps, disposé derrière l'estomac, n'était autre chose qu'une petite rate supplémentaire hyperplasiée que l'on n'avait pas aperçue pendant l'opération.

Les préparations étalées des divers organes, surtout de la moelle des os et des ganglions, ne présentaient point de phagocytose : partout on trouvait des spirilles libres. Par contre, sur les préparations étalées de la petite rate (les dimensions de la rate normale des singes étaient de 4c,5 de long et 2 centimètres de large) on voyait les tableaux les plus variés de phagocytose : on trouvait des microphages dont le protoplasme était presque complètement rempli de spirilles. Quelques-uns des

parasites avaient perdu leurs ondulations, et on voyait sur leur parcours, ou libres dans le protoplasme, des granulations colorées (voir la planche XV, fig. 1-6). Sur les coupes du foie, des reins, des poumons et du cerveau, colorées par la méthode décrite, on rencontrait dans les vaisseaux sanguins beaucoup plus de spirilles que chez les singes non dératés; en certains endroits ils étaient disposés dans les vaisseaux en amas en forme de faisceaux ou de flagelles, qui emplissaient presque la coupe transversale du vaisseau. On constatait la même chose dans la moelle des os et les ganglions, où il n'y avait pas non plus d'englobement de spirilles. D'autant plus frappantes étaient les préparations de la petite rate supplémentaire, sur lesquelles, malgré l'insuffisance des méthodes de coloration, on voyait une lutte intense entre les éléments cellulaires et les spirilles.

Déjà avant la découverte des spirilles, divers auteurs avaient remarqué que la rate des individus morts pendant la crise ou l'apyrexie présentait des modifications caractéristiques. Ces modifications consistaient en une hypertrophie des corps de Malpighi et en une formation d'amas leucocytaires, parsemés dans la pulpe de la rate. Chaque accès de la maladie est accompagné d'une formation nouvelle de ces amas, tandis que les amas précédents subissent des modifications régressives. De sorte que l'examen de la rate peut fournir des données pour préciser si la mort de l'individu est survenue après un ou plusieurs accès.

Déjà en 1870 M. Roudneff avait donné le nom de lymphomes inflammatoires aux formations leucocytaires décrites. M. Ponfick les croyait pathognomoniques pour la fièvre récurrente.

La simple comparaison de la rate extirpée chez le singe normal avec celle du singe tué au maximum de l'accès ou surtout pendant la crise, démontrait nettement le développement intense de ces lymphomes chez ce dernier; ce développement était tellement énergique dans la petite rate supplémentaire, que les lymphomes y étaient disposés littéralement les uns sur les autres.

L'examen microscopique démontra que les lymphomes sont constitués par des leucocytes pressés les uns contre les autres; une artère est disposée quelquefois à leur centre, et la périphérie est souvent entourée par un grand amas de globules rouges. La

dimension des lymphomes est différente : les uns sont petits et s'effacent peu à peu dans la pulpe environnante, les autres sont plus grands et assez nettement délimités. Les éléments cellulaires, faisant partie de l'amas, sont si rapprochés les uns des autres que le stroma est complètement imperceptible. Par-ci, par-là, on trouve entre eux de grandes cellules à grand noyau rond et à protoplasme finement granuleux (macrophages). Malgré la quantité de leucocytes nouvellement formés, les tableaux de mitose sont comparativement très rares.

Les spirilles étaient très abondants dans tous les vaisseaux sanguins de la préparation, maïs c'était surtout dans les poches veineuses de la périphérie des corps de Malpighi qu'ils étaient nombreux.

Dans les lymphomes mêmes, on ne trouvait que rarement des spirilles libres; ils étaient tous englobés dans les microphages. Leur nombre était surtout grand dans les macrophages, qui avaient alors l'aspect d'un amas épais de spirilles, repoussant de côté le noyau ou le recouvrant complètement.

Les phénomènes de phagocytose n'étaient pas également répartis dans tous les lymphomes : dans les uns ils étaient très nets, dans les autres, peu marqués, enfin dans d'autres, ils étaient complètement absents, les cellules ne contenaient pas de parasites, mais elles étaient elles-mêmes plus ou moins fortement modifiées. Leur protoplasme était trouble, leurs noyaux se coloraient mal, et on observait entre les cellules des dépôts de masses exsudatives qui se coloraient assez fortement en bleu foncé par la méthode décrite. Sur les préparations traitées par le liquide de Flemming, le protoplasme de certaines cellules présentait une dégénérescence graisseuse, la cellule et le noyau étant remplacés par un amas de détritus.

L'aspect macroscopique et les modifications microscopiques observées par moi sur la petite rate supplémentaire ressemblent beaucoup aux descriptions, faites par divers auteurs, des cadavres des individus morts de la fièvre récurrente (Küttner, Ponfick, Lubimoff, Pouchkareff, etc.). Cette ressemblance est encore augmentée par le foyer conique décrit dans la petite rate, et que l'examen microscopique a démontré n'être autre chose qu'un infarctus hémorragique. En laissant de côté les explications données de ces infarctus (Kuttner, Erichsen, Ponfick et d'autres),

je crois plus simple de les attribuer à des thrombus formés par les spirilles qui bouchent ainsi les petits faisceaux veineux.

Je ne m'arrêterai pas à la description des observations microscopiques des autres organes de ce singe, car ils ne présentaient rien de caractéristique que des faibles indices d'inflammation parenchymateuse.

IIe EXPÉRIENCE.

Le 26 septembre, on extirpa la rate à un singe mâle, grand et bien portant. Il s'était rétabli après l'opération aussi vite que le premier. La plaie s'était guérie par première intention.

Vingt jours après l'opération, le 14 octobre, on lui inocule sous la peau de l'aîne gauche, 0cc,5 de sang contenant des spirilles, sang retiré d'un malade le 3e jour de l'accès.

La période d'incubation a duré près de 4 jours. Les premiers spirilles furent trouvés le 5e jour après l'inoculation, la température étant de 37°3. La température de ce singe était plus élevée en général que celle du premier, mais elle ne dépassait pas pourtant 38°. (Tracé 6.) La quantité des spirilles avait augmenté

6

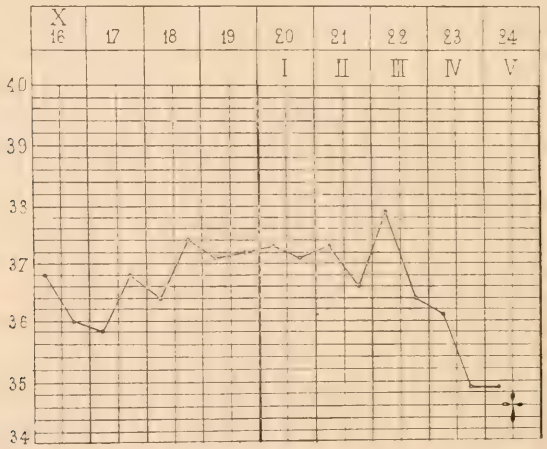


Fig. 6. — Tracé 6.

pendant la 6e journée ; elle était grande pendant le 7e jour ; le singe était malade ; de méchant il était devenu paisible et doux ; il ne mangeait pas, restait immobile, le dos voûté. Sa tempéra-

ture était montée à 38°, mais elle commença à baisser vers le soir et continua de le faire pendant le 8e et le 9e jours ; le sang contenait une énorme quantité de spirilles; le singe restait étendu sur le ventre et succomba à 6 heures du soir dans la 9e journée, ayant une température de 34°9.

Le sang des divers vaisseaux contenait d'immenses quantités de spirilles, quantités plus grandes encore que dans la 1re expérience. On ne rencontrait point du tout d'amas étoilés; les amas se présentaient en forme de boules ou pelotes irrégulières.

L'autopsie démontra ce qui suit : la plaie du ventre s'était complètement refermée; la quantité du sang dans le cerveau était modérée; le cœur non contracté; toutes ses cavités ainsi que les grands vaisseaux sanguins, remplis de caillots en partie décolorés.

Les poumons contenaient une grande quantité d'infarctus rouge foncé, de la dimension d'une tête d'épingle jusqu'à celle d'un noyau de cerise. Dans l'hypochondre gauche au-dessous et en partie derrière l'estomac, une péritonite purulente localisée. Un faisceau vasculaire de la rate extirpée, avec les restes des ligatures, était contenu dans la cavité purulente, qui avait la dimension d'un haricot. Pas de trace de la rate. Les reins sont quelque peu hypertrophiés; la couche corticale épaisse; le foie contient beaucoup de sang, son bord antérieur est un peu arrondi; et il y a une périhépatite étoilée sur la surface convexe du lobe droit. La muqueuse de l'estomac est gonflée et recouverte d'une mucosité gluante; la portion pylorique présente une hémorragie de la dimension d'une tête d'épingle. Les intestins sont vides; la muqueuse de l'intestin grêle est recouverte dans tout son parcours de nombreuses hémorragies punctiformes; les gros intestins sont fortement contractés; on observe aussi des hémorragies sur leur muqueuse, mais elles sont moins nombreuses quoique plus grandes. Il y a un petit foyer hémorragique dans le testicule droit.

Les ganglions des aînes, des aisselles, du péritoine, des bronches, sont hypertrophiés, hyperémiés, d'un rouge cerise en certains endroits.

La moelle du fémur est rouge et déborde sur l'incision de l'os, tandis que celle du tibia est pâle, légèrement jaunâtre.

Les préparations étalées sèches ne présentent aucun phénomène de phagocytose; les spirilles sont partout nombreux et libres. Dans toute une série de préparations faites avec le sang et la moelle des os, je n'ai trouvé que plusieurs microphages contenant des spirilles. Le pus de l'abcès du péritoine n'en contenait pas du tout.

L'étude des coupes faites avec les organes durcis donna les mêmes résultats. Autour des foyers hémorragiques du poumon et de l'intestin, les vaisseaux étaient presque complètement bouchés par les spirilles. La couche endothéliale des vaisseaux des divers organes était gonflée, trouble, elle s'insinuait dans le canal du vaisseau; quelquefois plusieurs cellules de cette couche étaient détachées et disposées librement dans le canal du vaisseau.

Cette modification de l'endothélium s'accordait tout à fait avec les observations multiples de cellules endothéliales détachées, que l'on trouvait dans le sang avant et tout de suite après la mort.

Dans les ganglions on observait, à côté de la dilatation vasculaire, des phénomènes d'hyperplasie; par-ci par-là on trouvait des tableaux de mitose, mais il n'y avait nulle part de spirilles dans les cellules.

Les autres organes parenchymateux, comme dans la première expérience, ne présentaient aucune modification caractéristique.

Tels sont les résultats de mes expériences. La littérature nous présente déjà des observations analogues aux miennes.

Ainsi, en 1888, M. le professeur Kourloff avait inoculé à des lapins dératés le charbon, le rouget du porc, le choléra des poules, le *streptococcus erysipelatis*, etc. Cet auteur déduit de ses expériences assez nombreuses, que « le rôle de la rate, dans la lutte de l'organisme avec les parasites qui l'envahissent, n'est nullement plus important que celui de tous les autres organes. C'est leur ensemble et non pas un organe ou un tissu quelconque qui lutte contre l'envahisseur ».

Ensuite, en 1889, M. Bardach avait inoculé le charbon au chien, animal peu sensible à cette infection. Sur 25 chiens dératés, il en succomba 19 au charbon généralisé, tandis que sur 25 des témoins, il n'en succomba que 5. Vu ces résultats,

M. Bardach croit que le rôle de la rate dans la lutte contre l'infection est prouvé.

Mes expériences sont très peu nombreuses en comparaison de celles qui viennent d'être citées. Néanmoins je crois pouvoir leur attribuer une certaine importance, et j'attire surtout l'attention sur le fait que les résultats obtenus ne sont pas accidentels et inattendus, mais correspondent rigoureusement et découlent même des données pathologo-anatomiques obtenues sur la fièvre récurrente par M. Metchnikoff.

En étudiant les différentes maladies infectieuses, nous observons que ce sont divers organes qui prennent part à la lutte engagée entre l'organisme et les microbes. C'est tantôt dans l'un, tantôt dans l'autre des organes, suivant leur richesse en phagocytes, que les microbes se localisent. La netteté de ces phénomènes de lutte est surtout grande dans des maladies chroniques, comme par exemple, la lèpre, où, non seulement les organes, mais même les tissus nerveux et osseux ne sont ni ménagés, ni exclus de la lutte. Dans d'autres maladies, comme le typhus abdominal, le rôle principal dans cette lutte appartient à la rate.

Nous avons vu que dans la fièvre récurrente la lutte avec les spirilles s'accomplit exclusivement dans la rate : c'est dans celle-ci que se rassemblent les spirilles avant la crise, et c'est là aussi où ils sont englobés et détruits par les microphages.

L'organisme dératé présente un milieu favorable à la culture des spirilles ; ceux-ci s'y propagent librement, sans que ni les ganglions, ni la moelle des os, ni le foie, ni même les cellules endothéliales des vaisseaux, qui sont pourtant en communication intime avec les spirilles, puissent le défendre des parasites, qui envahissent de plus en plus le sang.

Les doutes, émis par M. Baumgarten au sujet de l'application de la théorie phagocytaire à la fièvre récurrente, sont donc tout à fait sans fondement ; au contraire, on peut affirmer, en se servant des paroles de M. Metchnikoff, que « le meilleur choix que l'on puisse faire pour prouver la théorie phagocytaire, est l'étude de la fièvre récurrente ». Bien que les leucocytes du sang ne prennent pas une grande part dans la lutte de l'organisme avec les spirilles, il n'en est pas moins inexact de dire, comme M. Baumgarten l'a souvent fait, que dans la fièvre récurrente

« jamais aucun des microbes n'est ni digéré, ni même seulemen englobé par les globules blancs ».

Pour expliquer le fait que les spirilles ne sont englobés par les leucocytes que dans la période précédant la crise, et non au début même de l'accès, M. Baumgarten admet que, vers cette époque, les microbes périssent ou sont prêts à périr.

Les expériences de M. Metchnikoff, ainsi que les observations de beaucoup d'auteurs ne sont pas d'accord avec cette manière de voir; et, ce qui en démontre encore l'inexactitude, c'est ma première expérience, dans laquelle nous avons vu, d'un côté, dans le sang, des spirilles vivants, à mouvements très rapides, et d'un autre, des amas entiers de spirilles à l'intérieur des microphages de la rate.

En même temps que je faisais des expériences sur les singes, je tâchais de rassembler des matériaux pathologo-anatomiques sur des cadavres d'individus, morts de la fièvre récurrente. Je recherchais naturellement, surtout, les cas où la mort était survenue pendant la crise ou bientôt après. Malheureusement je ne pus en trouver à cette époque, l'épidémie n'amenant qu'une mortalité très faible. Mais au mois d'octobre, mon collègue, M. le docteur Nédelsky me procura la rate, le foie, les reins et le cœur d'un vieillard, ayant eu une maladie fébrile (le sang n'avait pas été examiné), et mort bientôt après un abaissement critique de température, dans l'hôpital militaire de Kieff. Malheureusement je ne puis présenter ici l'histoire complète de la maladie.

L'étude des organes démontre ce qui suit : dégénérescence graisseuse de la musculature du cœur; inflammation parenchymateuse du foie et des reins; rate très hypertrophiée, 19 centimètres de long; sa capsule fortement tendue.

La coupe de la pulpe, d'une coloration brun rouge foncé, est flasque; les travées sont complètement invisibles; mais, par contre, il y a une assez grande quantité de nodules blancs jaunâtres, de la dimension d'une tête d'épingle jusqu'à un grain de millet, parsemés dans toute la rate. En certains endroits ces nodules sont rares : en d'autres, ils sont plus resserrés, en petits amas.

L'aspect macroscopique de la rate était tellement caractéristique, qu'il n'y avait aucun doute sur ce que la maladie de l'individu n'était autre chose que la fièvre récurrente.

Se[illegible]xewitsch, del.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.

Une grande quantité de préparations étalées de la pulpe de la rate, préparations colorées par le bleu de méthylène phéniqué, ne présentèrent jamais de spirilles : par contre, on trouvait dans chaque préparation, faite avec les nodules, — corps de Malpighi, — des leucocytes, contenant des spirilles nettement visibles.

Deux cellules semblables sont représentées sur la planche XV, figures 7 et 8.

Je n'ai pu obtenir de préparations démonstratives avec les coupes colorées par la même méthode, et faites avec la rate durcie et conservée ; cela doit tenir à ce que l'organe n'était plus suffisamment frais.

Quoi qu'il en soit, vu les observations de M. Birch-Hirschfeld (en 1874), sur les spirilles (vivants?) dans les corps de Malpighi, et celles de M. Lubimoff (en 1884), sur le même sujet, nous pouvons admettre que les relations entre les phagocytes et les spirilles sont les mêmes chez l'homme que celles décrites chez le singe par M. Metchnikoff.

EXPLICATION DES FIGURES.

PLANCHE XIV

Fig. 1. — Sang d'un singe dératé. Les spirilles sont distribués en forme d'étoiles. Coloration par le violet de gentiane, Hartnack, système 9, oculaire 3.

Fig. 2. — Sang du second singe dératé. Les spirilles sont distribués sans ordre quelconque. Même coloration et même grossissement.

PLANCHE XV

Fig. 1, 2, 3, 4, 5 et 6. — Leucocytes de la rate supplémentaire, renfermant un grand nombre de spirilles. Coloration par le bleu de méthylène phéniqué. Hartnack. Apochrom. 2, 0, ocul. IV.

Fig. 7 et 8. — Deux leucocytes d'un corps de Malpighi de la rate humaine. Même coloration et même grossissement.

PLANCHE XVI

Leucocytes polynucléaires du sang, renfermant des spirilles englobés. Coloration par le violet de gentiane. Hartnack. Apochrom, 2, 0; ocul. IV.

Fig. 5 et 8. — Montrent aux points signalés par des traits la fragmentation des spirilles en parties.

Fig. 7 et 8. — Montrent les granules colorés sur le parcours des spirilles.

Fig. 7. — Montre les granules disséminés dans le protoplasme du leucocyte et les vacuoles contenues dans ces cellules.

PLANCHE XVII

Fig. 1 et 2. — Deux photogrammes de leucocytes du sang renfermant des spirilles englobés.

SPIROCHETA ANSERINA ET LA SEPTICÉMIE DES OIES

Par M. N. SAKHAROFF, de Tiflis.

(Avec les deux photogrammes, fig. 3, 4 de la Pl. XVII.)

Dans certaines stations du chemin de fer transcaucasien apparaît chaque été une maladie qui fait périr presque toutes les oies. Ces stations se trouvant dans les régions les plus paludéennes, j'ai étudié l'an dernier le sang des oies qu'on en avait rapportées, dans la pensée de trouver les amibes de la malaria. A ma grande surprise, je n'y ai trouvé que des spirochètes que j'ai montrées à la Société médicale du Caucase, le 2 octobre 1890. J'ai pu, cette année, ajouter à mes observations quelques données nouvelles, la maladie ayant reparu vers la fin du mois de mai.

Cette maladie ressemble au typhus. L'oie malade cesse de manger, reste assise, montre une apathie dont rien ne peut la faire sortir. Cela dure une semaine, ou plus, et elle meurt d'épuisement, après avoir présenté, dans le cours de la maladie, des températures de 42°,5-43°.

Certaines oies ont de la diarrhée et les jointures des pattes si sensibles qu'elles crient au moindre contact.

A la dissection, on constate un grand amaigrissement, la dégénérescence graisseuse du cœur et du foie, sur lequel on voit des granulations jaunâtres de la grosseur d'un grain de millet et de consistance caséeuse. La rate est molle et se brise sous le doigt. Au microscope, ni les organes, ni le sang ne présentent de microorganismes.

Il en est tout autrement sur l'animal vivant. Au commencement de la maladie, *on trouve dans le sang des spirochètes semblables à ceux de la fièvre à rechutes.*

Il faut faire avec soin la préparation, car ces spirochètes sont très délicates et s'écrasent facilement entre les deux verres du microscope. Leurs mouvements les dérobent parfois à l'obser-

vation. D'autres fois, on ne sait pourquoi, on ne les voit pas, alors qu'elles existent, et qu'il suffit de les colorer pour les apercevoir.

Leur forme la plus facilement visible est celle de pelotons qu'elles prennent quand la maladie est à son plus haut degré. La partie centrale du peloton est formée de spirochètes entrelacées, et tout autour on voit sortir, sous forme de rayons, des spirochètes en fils simples ou réunis à la façon des brins d'une ficelle. Tous ces rayons s'agitent, la masse change de place, et donne l'illusion d'un organisme unique occupant quelquefois tout le champ du microscope et visible avec les objectifs les plus faibles. Aussi faut-il, pour éviter de disloquer ces ensembles, laisser couler librement le sang, sans presser la griffe de l'oie qui le fournit.

Ces spirochètes, quand elles sont libres, ont des mouvements analogues à ceux de *Sp. Obermeieri*, c'est-à-dire qu'elles peuvent se mouvoir sans tourner autour de leur axe longitudinal, avec une immobilité complète des spires, et évidemment grâce à des cils invisibles à leurs deux extrémités. La longueur et le nombre des tours de la spire sont aussi variables que dans le spirille du typhus à rechutes, mais il y a ici plus de grosseur et un peu moins d'élasticité. Ces spirochètes ne se conservent guère qu'une ou deux heures dans les préparations.

Quand la spirochète est gênée dans ses mouvements, ceux-ci deviennent si variés qu'il est impossible de les décrire, mais n'ont jamais le caractère flexueux, en lanière de fouet, de ceux du *Polimitus hominis* ou *avium*.

Ce microbe diffère encore du *Vibrio Metchnikovii*, qu'on trouve également dans le sang sous forme de spirales, en ce qu'il est toujours spiraliforme, tandis que la forme dominante du *Vibrio Metchnikovii* est celle de bacilles courbés. Le caractère de la maladie, le résultat des inoculations et des dissections, tout est très différent avec les deux microbes. Je crois donc pouvoir considérer le mien comme une espèce nouvelle, et comme on le trouve presque exclusivement dans les oies, je l'ai appelé *Spirochæta anserina*, le rapprochant ainsi du *Sp. Obermeieri*, dont il a la forme, qui habite comme lui le sang, et peut, comme lui, être inoculé et donner une maladie typhoïde.

La présence de ces *Sp. anserina* dès le commencement de la

maladie, alors même que l'oie semble encore bien portante, leur multiplication graduelle jusqu'au moment où ils forment les pelotons dont j'ai parlé, et leur diminution et leur disparition la veille de la mort de l'oiseau, tout cela témoigne de leur relation avec la maladie. Mais ce qui le démontre mieux encore, ce sont les expériences d'inoculation. Après avoir introduit une petite goutte du sang d'une oie malade, contenant des spirochètes, dans un tube capillaire, je piquais ce tube sous la peau d'une oie saine, et je l'y cassais. Invariablement l'oie est devenue malade 4 à 5 jours après l'inoculation : une seule a attendu le 10e jour. Toutes avaient dans le sang des spirochètes. Sur huit expériences, j'ai eu huit succès.

Sur 2 poulets inoculés de la même façon, un seul a présenté des spirochètes dans son sang, le quatrième jour après l'inoculation. Il s'est rétabli ensuite.

L'inoculation de 4 pigeons et de moineaux est restée sans résultat.

Je n'ai réussi à cultiver ces spirochètes sur aucun milieu artificiel. On sait qu'on n'a pas été plus heureux avec le *Sp. Obermeieri*. J'espère que la découverte d'un nouveau membre de la famille aidera à nous faire connaître l'histoire du développement des spirochètes du typhus à rechutes, encore inconnu[1]. C'est, en tout cas, ce qui me pousse à continuer ces recherches.

PLANCHE XVII

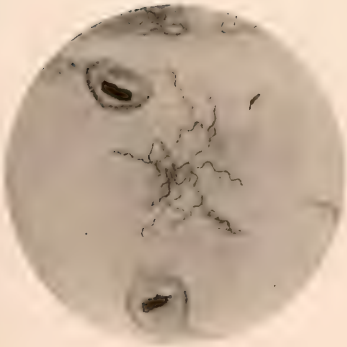
Fig. 3 et 4 représentent les spirilles dans le sang des oies malades.

1. J'ai reconnu l'inexactitude des observations que j'avais publiées sur le développement du *Sp. Obermeieri* des plasmodies. J'avais eu affaire, sans m'en douter, à des cas de fièvre à rechutes, compliqués de malaria. C'est pourquoi j'avais trouvé dans le sang des malades des spirochètes avec des plasmodies, et des leucocytes mélanifères. M. Karlinski a décrit deux cas pareils. (*Fortschr. d. Medicin*, juin 1891.)

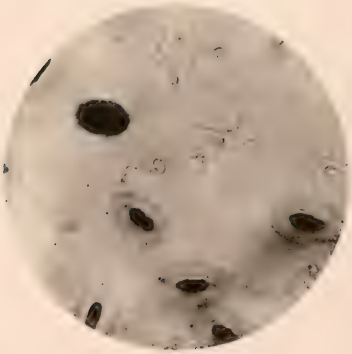
1

2

4



3



Héliotypie G. Pilarski Gentilly.

RECHERCHES

SUR L'ACCOUTUMANCE AUX PRODUITS MICROBIENS

PAR MM. EL. METCHNIKOFF ET T. ROUDENKO.

Pour expliquer les phénomènes si remarquables de l'immunité vis-à-vis des maladies infectieuses, acquise à la suite de vaccinations préventives, on a souvent invoqué l'analogie avec l'accoutumance de l'organisme aux différents toxiques, tels que la morphine, l'arsenic, etc. On s'est demandé ensuite si cette accoutumance devait être attribuée à toutes les cellules de l'animal vacciné, ou bien seulement à quelques éléments spécifiques de l'organisme. Ainsi, un de nous a émis la supposition que c'étaient principalement les cellules phagocytaires, comme organes de la résistance de l'organisme contre les microbes infectieux, qui s'accoutumaient aux toxines pendant la vaccination. De Bary, en s'associant à cette manière de voir, l'appuya sur l'analogie de ces phénomènes avec « l'accoutumance du plasmode des Myxomycètes au contact et probablement aussi à l'englobement des corps dont il s'éloignait avec énergie au début »[1].

D'autres observateurs crurent plutôt à une accoutumance générale de l'organisme vacciné. C'est ainsi que M. Gamaleïa[2] exprimait en 1888 l'idée que « l'assuétude se fait probablement dans toutes les cellules nerveuses, leucocytaires et endothéliales. Habituées à ce poison, ces cellules ne se paralysent plus par son action, et peuvent se comporter vis-à-vis de la bactéridie virulente comme vis-à-vis d'une bactéridie banale ou d'un corps étranger quelconque ». M. Arloing[3], insistant sur la dif-

1. *Vorlesungen uber Bacterien*, 1885, p. 109.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1888, p. 551.
3. *Archives de médecine expérimentale*, 1890.

férence très grande entre la sensibilité de diverses espèces animales vis-à-vis de toxines bactériennes, cherche à expliquer certains cas d'immunité naturelle par l'indifférence de l'organisme pour ces produits. Il ajouta la réflexion que, dans l'immunité acquise, un rôle plus ou moins grand est joué par « l'accoutumance des éléments aux produits solubles ».

Quoique la science ne possédât pas encore de données suffisantes pour résoudre la question, il y avait déjà quelques faits établis montrant la sensibilité des animaux vaccinés vis-à-vis des toxines injectées d'emblée. M. Chauveau[1] démontra en 1879 que les moutons, devenus ultra réfractaires à la suite de vaccinations répétées, éprouvent un « malaise très grave », quoique « très fugitif », à la suite d'une injection d'un centimètre cube de sang charbonneux, ce qu'il explique par la résorption d'une petite quantité du poison soluble introduit. Mais comme le sang renfermait en même temps un grand nombre de bactéridies, on pouvait attribuer une part de l'influence nocive à l'action des microbes.

Le premier exemple d'une accoutumance aux poisons microbiens a été découvert par M. Beumer[2] lorsqu'il démontra que l'injection répétée des cultures stérilisées du bacille typhique rend les souris réfractaires à des doses mortelles de cette toxine.

Un fait non moins remarquable, quoique diamétralement opposé, a été constaté par M. Gamaleïa sur les cobayes vaccinés contre la bactérie qu'il a découverte et décrite sous le nom de *Vibrio Metchnikovii*. Dans ce cas, les animaux vaccinés deviennent réfractaires à l'infection par le microbe, mais ne s'accoutument point aux doses toxiques des cultures stérilisées. La dose de ces cultures, nécessaire pour donner la mort, est la même pour les cobayes neufs, et pour ceux qui ont déjà reçu auparavant des doses variées des mêmes produits. Ce fait remarquable a été ensuite confirmé par M. Charrin[3] pour le bacille pyocyanique. Les lapins vaccinés contre ces microbes ne manifestèrent aucune accoutumance vis-à-vis des doses mor-

1. *Revue de médecine et de chirurgie*, 1879, et *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 1888, t. CVI, p. 393.
2. *Der derzeitige Standpunkt der Schutzimpfungen*, 1887, p. 4.
3. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1890, n. 17.

telles de cultures stérilisées. Dans la discussion qui s'engagea à la Société de biologie, à la suite de cette communication de M. Charrin, M. Duclaux [1] fit remarquer que les faits constatés n'étaient point suffisants pour rejeter la théorie de l'accoutumance.

Quelque temps après, MM. Charrin et Gamaleia [2] communiquèrent de nouvelles expériences sur la vaccination et l'accoutumance, d'après lesquelles les lapins vaccinés contre la maladie pyocyanique seraient même plus impressionnables vis-à-vis des poisons du microbe du pus bleu que les animaux non vaccinés.

M. Selander [3] démontra, de son côté, que les lapins vaccinés contre le microbe du choléra des porcs, « meurent comme les témoins si on leur injecte dans les veines, non pas une dose exagérée, mais la dose ordinairement mortelle de sang virulent chauffé ».

Tirant la conclusion de l'ensemble des faits acquis, M. Bouchard [4], dans son discours au Congrès international de Berlin, formule sa conviction de la façon suivante : « Ne parlons donc plus, dans la question de l'immunité acquise, d'entraînement des leucocytes et d'accoutumance des cellules nerveuses aux poisons bactériens : c'est pure rhétorique. »

Quelques mois plus tard, MM. Behring et Kitasato [5] publièrent leur découverte que les lapins vaccinés contre le tétanos étaient non seulement réfractaires aux infections par le microbe vivant, mais étaient encore capables de supporter sans trouble des doses vingt fois plus grandes que celles qui suffisent pour donner la mort à des lapins non vaccinés. Dans une note de ce mémoire, ainsi que dans sa publication sur le phénomène analogue dans la diphtérie [6], M. Behring déclare ne pas voir dans ce fait un exemple d'accoutumance, parce que dans le cas de tétanos il s'agit simplement d'une propriété acquise de détruire la toxine dans l'organisme vacciné.

Par contre on considère généralement comme une accou-

1. *Semaine médicale*, 1890, n. 21 p. 172.
2. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 1890, n. 19, p. 294.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, p. 563.
4. Essai d'une théorie de l'infection. Berlin, 1890, p. 18.
5. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1890, n. 49, p. 1114.
6. *Ibid.*, n. 50, p. 1147.

tumance l'affaiblissement et même la cessation de toute réaction chez les tuberculeux, à la suite d'injections répétées de tuberculine. M. Koch [1] a d'abord attribué en grande partie ce fait à la disparition du tissu tuberculeux, mais il a été démontré par un grand nombre d'observations que dans les cas où ce tissu se conserve en abondance, la réaction ne s'en affaiblit pas moins, ou disparaît à la suite d'une sorte d'accoutumance.

Vu la grande portée théorique de la question de l'accoutumance et l'insuffisance des faits acquis, nous nous sommes proposés de contribuer par des expériences nouvelles à l'étude de ce problème compliqué.

II

Persuadés de la sensibilité des lapins, vaccinés contre le virus pyocyanique vivant, vis-à-vis des doses considérables de cultures dans du bouillon stérilisées à 115°, nous avons tâché de renforcer l'immunité à l'aide d'injections répétées de ces cultures. Dans ce but nous avons introduit sous la peau des lapins des doses fractionnées de cultures stérilisées allant jusqu'à un total de 112 à 130^{cc} [2]. Quelquefois, pour éprouver la résistance et aussi pour la renforcer, nous avons injecté dans les veines jusqu'à 30^{cc} des mêmes cultures stérilisées.

Les lapins ainsi préparés nous ont servi pour l'examen de l'accoutumance. Dans nos expériences nous avons introduit dans la veine auriculaire de lapins hypervaccinés, ainsi que de lapins neufs (témoins), des cultures pyocyaniques stérilisées à 115°, en quantité variant de 35 à 90^{cc} pour chaque animal.

Dans deux expériences sur quatorze, les lapins hypervaccinés se sont montrés beaucoup plus sensibles à l'action des toxines pyocyaniques que les témoins. Ainsi un lapin, pesant 2,200 gr., qui avait reçu à plusieurs reprises 115^{cc} sous la peau, et qui avait résisté à une injection de 30^{cc} dans la veine, a succombé à la suite d'une seconde injection intraveineuse de 35^{cc} d'une culture âgée de trois jours. Son témoin a résisté. Un autre lapin, vacciné par 130^{cc}, et éprouvé par une injection intraveineuse de 27^{cc}, est

1. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, 1890, n. 46, *a*.
2. La dose de 60^{cc} de culture stérilisée est suffisante pour vacciner contre le virus vivant.

mort après une injection de 40^{cc} d'une culture âgée de trois jours dans la veine auriculaire. Son témoin a éprouvé des troubles considérables, mais a fini par résister.

Dans une troisième expérience, la mort du vacciné est survenue presque en même temps que celle du témoin.

Dans deux autres, les lapins hypervaccinés ont eu une survie de 9 heures et de 4 jours par rapport à leurs témoins.

Dans sept expériences, c'est-à-dire juste dans la moitié de nos cas, les lapins hypervaccinés ont résisté, tandis que leurs témoins sont morts immédiatement ou quelques heures après l'injection. Une fois seulement la mort du témoin est survenue douze jours après l'introduction de la culture. Et cependant les doses supportées par les lapins hypervaccinés se sont élevés jusqu'à 86 et même 90^{cc}.

Dans une expérience, où le lapin hypervacciné a résisté à une injection de 70^{cc}, le témoin est resté vivant, quoique malade, et dans une autre, le lapin d'expérience ainsi que le témoin supportèrent tous deux sans troubles graves une injection de 60^{cc}.

On voit, d'après cet aperçu, que les lapins peuvent être accoutumés au moins dans la moitié des cas aux doses mortelles de toxines pyocyaniques, et qu'en tout cas les lapins hypervaccinés ne sont qu'exceptionnellement plus sensibles à ces toxines que les lapins neufs. En même temps il faut constater que cette accoutumance acquise n'est point chose constante ou très facile à réaliser. Pour cette propriété, comme pour la vaccination contre le bacille pyocyanique, on observe assez souvent des exceptions à la règle, ce qui crée une difficulté pour l'expérimentation. Le grand inconvénient consiste dans le caractère chronique que revêt parfois l'infection ou l'intoxication pyocyanique. La mort survient alors des semaines et même des mois après le début de l'expérience, lorsqu'on serait tenté de considérer les animaux comme parfaitement indemnes. Ainsi il nous est arrivé de perdre des lapins qui avaient reçu à plusieurs reprises des doses de cultures vivantes plus que suffisantes pour donner l'immunité. Il nous a donc fallu, pour étudier le phénomène de l'accoutumance, nous adresser à un autre microbe, vis-à-vis duquel la vaccination présentât plus de sûreté et de constance. C'est au *Vibrio Metchnikovii* que nous nous sommes adressés, non seulement parce qu'il répond à ces conditions, mais parce que c'est

justement chez lui qu'a été d'abord découverte la sensibilité si remarquable des animaux vaccinés.

III

Nos expériences ont confirmé la découverte de M. Gamaleïa de la grande sensibilité des cobayes, vaccinés contre le vibrion, pour les doses mortelles de cultures stérilisées de ce microbe injectées d'emblée. Nous avons perdu plusieurs cobayes suffisamment vaccinés, après leur avoir introduit sous la peau des quantités assez grandes de ces cultures. Voici quelques exemples de cette sensibilité.

Un cobaye vacciné au mois de décembre 1890, par des injections répétées de cultures stérilisées à 115°, résiste à une injection sous-cutanée de $2^{cc},5$ d'une culture, stérilisée à 100° quinze jours avant l'expérience. Deux jours après, le 4 janvier 1891, il reçoit sous la peau une nouvelle dose de 3^{cc} du même liquide, et en meurt 17 heures plus tard, avec un très grand épanchement péritonique sanglant.

Un autre cobaye, vacciné à la même époque que le précédent, résiste non seulement aux injections de $2^{cc},5$ et 3^{cc} (celle qui a tué le premier cobaye mentionné), mais survit à une seconde injection de 3^{cc} du même liquide. Le 9 janvier, il reçoit sous la peau de l'abdomen 4^{cc} d'une culture, stérilisée la veille à 100°, et meurt le lendemain avec l'exsudat péritonique si caractéristique pour l'intoxication vibrionienne. Son témoin, un cobaye de la même taille, non vacciné, résiste à une injection de 4^{cc} du même liquide.

Même dans les cas où les cobayes vaccinés résistent aux doses mortelles pour leurs témoins, ils présentent des troubles graves de leur santé, des œdèmes à l'endroit de l'injection, c'est-à-dire des phénomènes qui indiquent l'activité de la substance toxique introduite dans leur organisme.

Et pourtant il est possible d'accoutumer les cobayes à des doses mortelles de cultures stérilisées, résultat que nous avons obtenu à plusieurs reprises, comme le démontrent les exemples suivants :

1. Un cobaye, vacciné au mois de décembre 1890 par des doses répétées de cultures stérilisées à 100°, fut soumis pendant la première moitié de janvier à 5 injections de 4; 4,5; 4; 5,5 et 6^{cc}. Le 16 janvier ce cobaye, qui atteint le poids de 728 grammes, reçut en injection sous-cutanée une dose de $7^{cc},28$ de culture du vibrion dans le bouillon de pieds de veau, stérilisée

à 100°. Le cobaye résista à cette épreuve, tandis que son témoin, pesant 572 grammes et qui reçut 5cc,72 du même liquide était mort le lendemain matin.

Le même cobaye d'expérience dont le poids, malgré l'épreuve à laquelle il fut soumis, monta le 25 janvier à 748 grammes, résista encore à la dose de 7cc,48 d'une culture sérilisée le 22 janvier, tandis que son témoin, pesant 615 grammes mourut 11 heures et 30 minutes après l'injection sous-cutanée de 6cc,15 du même liquide.

2. Un gros cobaye de plus de 700 grammes, vacciné par une injection de 5cc, et qui résista à une épreuve avec 7cc,12 de culture dans le bouillon de veau stérilisé à 100°, a été soumis à l'expérience suivante. Le 13 mars on lui injecte sous la peau de l'abdomen 7,35cc (à raison de 1cc pour chaque 100 grammes du poids) d'une culture dans le bouillon de pieds de veau, âgée de douze jours et stérilisée à 100° huit jours avant l'expérience. En même temps on injecta sous la peau d'un témoin, pesant 565 grammes, 5cc, 65 du même liquide. Le témoin mourut 13 heures 30′ après l'injection avec des lésions caractéristiques (œdème et épanchement péritonéal), tandis que le cobaye vacciné guérit promptement.

Ce dernier a reçu huit jours plus tard une dose exagérée de 12cc du même liquide que dans l'expérience précédente, malgré que son poids n'était que de 785 grammes. Le cobaye a eu à la suite un fort œdème sous-cutané, mais finit par se rétablir définitivement. Son témoin, un gros cobaye de 715 grammes, qui ne reçut que 7cc,5 du liquide, mourut 9 heures et demie après l'injection.

3. Avant qu'il fût établi que les cobayes peuvent être assez facilement habitués à des doses considérables de toxines vibrioniennes, nous avons essayé de les accoutumer avec de faibles doses plusieurs fois répétées. Un cobaye de cette série a reçu, depuis le 20 novembre 1890 jusqu'au 11 janvier 1891, vingt-quatre injections de 1 à 2cc du liquide stérilisé, faisant un total de 28cc,5. Après l'avoir éprouvé par des doses de 3; 4; 4,5cc, nous lui avons injecté, vu que son poids s'est accru jusqu'à 462 grammes, 4cc,62 de culture dans le bouillon de pieds de veau stérilisée. Il s'ensuivit un fort œdème à l'endroit de l'inoculation, mais le cobaye résista, tandis que son témoin, pesant 615 grammes, et injecté avec 6cc,15 du même liquide, mourut 11 heures et demie après l'injection.

Plus tard ce cobaye a servi encore pour plusieurs expériences, dans lesquelles il résiste à des doses mêmes exagérées, dépassant 1cc pour 100 grammes du poids, tandis que les témoins succombèrent à des doses injectées en proportion de 1 %.

Dans une dernière expérience, faite au mois d'août 1891, ce cobaye, ayant un poids de 617 grammes, a reçu sous la peau de l'abdomen 12cc,5 (c'est-à-dire plus de 2 pour chaque 100 grammes de poids) d'une culture de vibrion, faite dans le bouillon de pieds de veau, et stérilisée à 115°. Malgré cette dose exagérée, le cobaye, qui eut un fort œdème à l'abdomen, résista parfaitement, tandis que six cobayes témoins moururent avec de lésions caractéristiques. Parmi ces témoins il y avait trois cobayes vaccinés contre le virus

vivant, deux cobayes neufs et un cobaye également neuf, mais issu d'une mère hypervaccinée qui avait manifesté une accoutumance très considérable.

De même que le lapin peut être accoutumé aux doses toxiques des cultures pyocyaniques, le cobaye peut l'être également pour les produits toxiques du microbe de la septicémie vibrionienne. En étudiant ces phénomènes d'accoutumance, il faut toujours tenir compte des influences qui augmentent ou diminuent la sensibilité des animaux pour les toxines bactériennes. Les lapins aussi bien que les cobayes présenteut des cas d'insensibilité naturelle pour ces produits. De même qu'il y a des cobayes qui résistent, sans vaccination préalable, aux virus vibrioniens vivants à dose mortelle, il y a aussi des individus qui manifestent une insensibilité plus ou moins considérable vis-à-vis de doses de cultures stérilisées, mortelles pour la grande majorité des cobayes.

D'un autre côté il y a des influences capables de vaincre l'accoutumance acquise même à un degré très prononcé.

M. Gamaleia [1] a déjà signalé dans une note de son mémoire que les cobayes tuberculeux étaient particulièrement sensibles aux toxines vibrioniennes. Ce fait a été maintes fois observé dans le courant de nos recherches. Cette sensibilité est même tellement remarquable qu'on était tenté, alors que le secret de la tuberculine n'était pas encore dévoilé, de supposer que la substance agissant d'une façon spécifique sur la tuberculose des cobayes serait d'origine vibrionienne. Tandis que les cobayes sains ne réagissent à des doses faibles ou moyennes de cultures stérilisées du vibrion que par une élévation de température de courte durée, chez des cobayes manifestement tuberculeux la température, après une hausse passagère, tombe brusquement, et les cobayes meurent avec une hypérémie très considérable des foyers tuberculeux.

Les cobayes vaccinés contre la septicémie vibrionienne, et même accoutumés à des doses mortelles des toxines de ces vibrions, ne sont nullement préservés contre la tuberculose. Mais ces animaux, devenus manifestement tuberculeux, perdent leur accoutumance contre les toxines vibrioniennes. Parmi

1. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, p. 543.

plusieurs expériences à l'appui de cette donnée, je ne citerai que la suivante.

Un gros cobaye, vacciné en décembre 1890 contre le vibrion par des doses répétées de cultures stérilisées, a été pendant le mois de janvier éprouvé par des doses de 4 à 6cc de cultures très toxiques. Le 16 janvier il résista à une dose de 7cc,28 de culture stérilisée, donnée à raison de 1 0/0 du poids. Malgré les troubles occasionnés par cette épreuve, le cobaye se rétablit complètement. Le 25 janvier, il a été de nouveau éprouvé par une dose de 7cc,48, vu que le poids du cobaye a augmenté jusqu'à 748 grammes. Les témoins de cette épreuve, comme dans la précédente, moururent à la suite de l'intoxication. Le 7 février, le cobaye reçut de nouveau une dose de 7cc,5 d'une culture stérilisée à 100°, mais cette fois-ci il mourut 4 heures et demie après l'injection. L'autopsie démontre, en dehors de lésions caractéristiques pour l'intoxication vibrionienne, la présence d'une tuberculose déjà généralisée. Outre un abcès tuberculeux de la paroi abdominale, le cobaye présente des ganglions des aisselles caséifiées, des tubercules dans le foie et une rate très hypertrophiée. Il est évident que l'animal contracta la tuberculose dans sa cage, ayant présenté dans ses œdèmes abdominaux, à la suite des injections multiples, une porte d'entrée facile au virus tuberculeux. Puisque les lésions tuberculeuses étaient déjà assez avancées, il est évident que le cobaye était déjà infecté au moins lors de sa dernière épreuve au mois de janvier. Il ressort donc de ce fait que l'accoutumance pour la toxine vibrionienne n'a été vaincue que par une tuberculose déjà généralisée dans les viscères abdominaux.

III

De toutes les données réunies dans cet article, il ressort avec évidence que, même dans les infections qui se distinguent par un caractère de toxicité très prononcé, l'accoutumance peut être obtenue sans grande difficulté. Il ne s'agit pas ici de phénomènes analogues à ceux qui ont été découverts par MM. Behring et Kitasato, et dans lesquels leurs animaux vaccinés contre le tétanos supportèrent facilement des doses vingt fois plus grandes que celles qui amènent la mort chez les animaux neufs. Tandis que dans ce cas il s'agit d'une propriété antitoxicide de l'organisme vacciné, dans les intoxications étudiées par nous, les produits bactériens manifestent leur action pathogène dans l'organisme hypervacciné. Ainsi, dans toutes nos expériences avec la septicémie vibrionienne, les cobayes hypervaccinés

présentèrent des œdèmes à l'endroit de l'injection et d'autres troubles plus ou moins prononcés.

Mais si l'accoutumance contre les toxines peut être réalisée, cela ne prouve pas encore que c'est dans cette propriété que consiste la vaccination. Tout au contraire. L'organisme vacciné contre l'infection peut être (comme dans les deux maladies que nous avons étudiées) tout aussi peu accoutumé à des doses mortelles des toxines que le non vacciné. La vaccination dans ces cas consiste plutôt en une accoutumance spéciale d'une catégorie des éléments du corps. Comme l'a démontré l'un de nous[1], chez les cobayes vaccinés contre le *vibrio Metchnikovii*, malgré que leur organisme entier ne soit point accoutumé aux toxines de ce microbe, il renferme néanmoins une espèce de cellules qui, elles, s'accoutument plus facilement au poison vibrionien. Ces cellules, phagocytes mobiles, au lieu d'être repoussées par les toxines, se dirigent vers ces dernières, et englobent les vibrions, les empêchant de produire leurs toxines et les tuant à la fin de la lutte.

1. Ces *Annales*, 1891, n. 8.

Erratum. — Dans cet article du n° 8 des *Annales*, p. 472, ligne 26, lire « cobayes non vaccinés » au lieu de « cobayes vaccinés ».

RECHERCHES SUR LES ORGANISMES DE LA NITRIFICATION

(5e MÉMOIRE),

PAR M. S. WINOGRADSKY.

(Avec la planche XVIII.)

SUR LA FORMATION ET L'OXYDATION DES NITRITES DANS LA NITRIFICATION

La nitrification a été toujours considérée par les chimistes comme un phénomène qui mène essentiellement à la production de nitrates. Dans la nature, ainsi que dans les expériences imitant les conditions naturelles, on n'a observé la formation de nitrites que comme une exception rare.

Les idées nouvelles sur la cause vivante de la nitrification ont eu pour conséquence de provoquer de très nombreuses expériences dans des milieux liquides, facilement contrôlables au microscope, et on a constaté tout de suite, dans ces conditions, un changement notable dans le caractère du phénomène : l'oxydation de l'ammoniaque tendait à rester incomplète, l'acide nitreux apparaissait en quantités considérables. M. Warington[1] et MM. Schlœsing et Müntz[2] l'ont noté presque en même temps.

M. Warington, qui alors déjà appréciait ce fait à sa juste valeur et qui a consacré depuis le plus de temps et d'efforts à son étude, a fait connaître là-dessus plusieurs observations intéressantes, mais dont l'interprétation restait complètement obscure. Voici le résumé de ses conclusions : la nitrification s'arrête tantôt à la formation de nitrite ; tantôt un phénomène secondaire se déclare qui aboutit à une oxydation complète de ce corps ; quelquefois enfin, mais très rarement, l'azote ammoniacal prend

1. *J. Ch. Soc.*, 1879.
2. *C. R.*, t. LXXXIX, 1879.

tout de suite l'état d'azote nitrique, sans qu'on observe l'apparition de corps incomplètement oxydés. Mais le pouvoir de produire les nitrates, alors même qu'on l'a constaté à l'origine, tend à s'affaiblir dans les expériences successives en milieux liquides et finit par disparaître.

Ces observations anciennes étaient sujettes à une objection, celle qu'aucun moyen efficace n'ayant été appliqué pour épurer l'agent nitrificateur, les liquides nutritifs étant de plus additionnés de substances organiques, les nitrites pouvaient très bien résulter de la réduction des nitrates et non de l'oxydation de l'ammoniaque. C'est ce qu'ont pensé MM. Gayon et Dupetit[1], et l'objection paraissait très bien fondée. Mais les recherches ultérieures de M. Warington et celles de M. Munro ont démontré que cette réduction ne suffit pas pour expliquer le fait dont il s'agit. M. Munro[2], notamment, a vu les nitrites se former dans ses expériences avec une eau de puits, non additionnée de substance organique; il a observé ensuite[3] que la présence de nitrate dans la solution ammoniacale en voie de nitrification n'a aucune influence sur la quantité de nitrite formé.

Les publications récentes de M. et Mme Frankland[4], de M. Warington[5] et les miennes[6] ont été décisives dans cette question. Tous ces observateurs se sont appliqués à expérimenter avec des cultures pures des organismes nitrificateurs, et immédiatement ce qu'il y avait encore d'inconstant et de changeant dans le phénomène a fait place à un résultat très net: non seulement les nitrites se forment souvent et en abondance, comme l'ont fait ressortir les premières tentatives pour isoler les ferments, mais ces nitrites sont presque le seul produit de la nitrification en culture pure, ou même épurée à un degré suffisant.

Il est arrivé ainsi que la connaissance d'un organisme nitrificateur, loin d'amener la solution du problème de la nitrification, a fait naître des questions nouvelles et difficiles; mais au moins

1. Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits. Nancy, 1886.
2. *Journal of the Chem. Soc.*, 1886.
3. *Chem. News*, 1887.
4. *Philosoph. Transactions of the Royal Soc.*, 1890.
5. *Chem. News*, 1890.
6. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, nos 4,5, 12.

ces questions étaient clairement posées, et les moyens donnés pour les résoudre.

Quant à l'interprétation de ces faits nouveaux, il est très naturel que presque tous les observateurs aient considéré la nitrification dans le sol comme le phénomène normal, et cherché l'explication de la formation d'acide nitreux dans des influences défavorables paralysant l'énergie du ferment. MM. Schlœsing et Müntz ont été les plus affirmatifs sur ce point. Mais l'expérience n'a pas confirmé ce qu'ils ont dit de l'influence, dans ce sens, des conditions de culture.

De cette même idée est venue aussi l'hypothèse qui admet que la culture prolongée dans un milieu liquide a pour effet de modifier de plus en plus profondément la nature du ferment; son pouvoir de produire les nitrates diminue *graduellement* et finit par se perdre complètement.

Une autre hypothèse admet que la formation d'acide nitrique exige le concours de deux organismes toujours présents dans le sol, mais dont l'un disparaît facilement de nos cultures et avec lui la production de nitrates.

M. Duclaux le premier, je crois, a exprimé cette idée[1]. M. Warington, qui s'est occupé dans le cours de ses recherches surtout de la première des deux hypothèses, tendait finalement vers la seconde, tout en regardant les deux comme probables. Elles sont évidemment les seules qui méritent une étude approfondie. Une idée très tentante au premier abord, celle de chercher la cause de la production de nitrates dans la nature, dans des réactions purement chimiques dont le sol est le siège, devient tout de suite improbable, du moment que ce phénomène n'est nullement lié au milieu naturel, mais se poursuit aussi quelquefois dans nos cultures, quoique plus difficilement.

Tel était l'état de la question qui nous intéresse, quand je l'ai reprise en octobre 1890. Cette partie de mes recherches était terminée quand deux nouveaux travaux ont paru, ceux de M. Müntz[2] et de M. Warington[3]. Ces travaux seront discutés

1. *Microbiologie*, p. 714.
2. De la formation des nitrates dans la terre, *C. R.*, t. CXII, n° 20.
3. On nitrification, part IV. *J. Chem. Soc.*, p. 485.

après l'exposition de mes nouveaux résultats, que j'ai eu déjà l'occasion de résumer dans une note présentée à l'Académie des Sciences, séance du 13 juillet 1891.

I

Le fait que la production de nitrites devenait de plus en plus abondante à mesure de l'épuration des ferments donnait presque le droit de conclure, au point de vue microbiologique, que la formation d'acide nitreux est leur seule fonction. Mais l'énigme que comportait cette conclusion empêchait de l'accepter, avant qu'on n'eût attaqué le problème de tous les côtés. Comment, en effet, s'expliquer qu'un organisme, possédant des moyens énergiques d'oxydation, termine son action par la production d'un corps chimique beaucoup plus oxydable que celui du début? En admettant même qu'il n'est pas capable de faire d'emblée l'oxydation complète de l'ammoniaque, comment comprendre qu'il paraisse totalement dépourvu d'action sur l'acide nitreux, alors que l'oxydation de ce corps pourrait lui fournir un surcroît d'énergie? Il est vrai qu'on connaît des exemples de l'extrême spécialisation de l'action chimique dans le monde des microbes; moi-même j'en ai donné de très frappants. Mais ce cas du ferment nitreux paraissait comme une exagération dans cet ordre d'idées. Venait ensuite la grande expérience des chimistes, qui se sont habitués à considérer la production de nitrates aux dépens de l'ammoniaque comme un phénomène indivisible, pour rendre toute décision encore plus difficile.

Le plan que je me suis tracé était en grandes lignes celui-ci :

1° Etudier les symptômes de l'affaiblissement apparent de la fonction oxydante dans le milieu liquide, pour voir s'il est réel ou si d'autres phénomènes le dissimulent.

2° Tâcher de découvrir chez ces ferments soi-disant nitreux quelques vestiges de cette propriété de produire les nitrates, en l'admettant pour le moment comme perdue. En cas de succès, tâcher de l'exalter et de la leur restituer par culture appropriée.

3° Poursuivre en même temps la recherche d'un agent actif de la production de nitrates, différent de celui de la transformation de l'ammoniaque en nitrite.

En me mettant à ce travail j'avais à ma disposition un certain nombre d'échantillons de terre de provenance différente, européenne et exotique [1].

J'ai tenu à les avoir pour faire une étude comparée des organismes nitrificateurs, qui me paraissait présenter de l'intérêt sous plusieurs rapports. Au lieu de procéder immédiatement à l'isolement des organismes spéciaux de ces terres, par les moyens que j'ai décrits, je résolus de prolonger indéfiniment la période préliminaire d'épuration, et de laisser pousser librement tout ce qui pouvait se maintenir dans le milieu liquide usuel. Je rappelle la composition de celui-ci.

Eau distillée.	1,000
Phosph. de potasse	1
Sulf. de magnésie.	0.5
Chlorure de calcium	trace.

Chaque matras recevait en outre du carbonate de magnésie fraîchement lavé à l'eau bouillante, en petit excès.

Les vases ainsi chargés étaient stérilisés, et après la stérilisation on ajoutait 2^{cc} d'une solution à 2 0/0 de sulfate d'ammoniaque, ce qui fait, pour 15 à 20^{cc} de liquide, 2 à 2,5 pour mille.

Il est facile de comprendre pourquoi je ne hâtais pas l'isolement des ferments de ces terres. Premièrement, toutes les observations sur l'affaiblissement du pouvoir oxydant ont été faites sur des cultures ensemencées simplement par de la terre fraîche et dans des cultures filles de celles-ci. Il fallait donc s'en tenir là. Ensuite, l'hypothèse des deux ferments, l'un nitreux, l'autre nitrique, qu'il ne fallait pas oublier, s'opposait pour le moment à l'isolement d'un *seul* organisme.

Voici les noms des localités d'où provenaient mes échantillons de terre :

EUROPE.	AFRIQUE.	ASIE.	AMÉRIQUE.	AUSTRALIE.
Zurich.	La Reghaïa.	Buitenzorg (Java).	Campinas (Brésil).	Melbourne.
Gennevilliers.	Rouiba.	Tokio (Japon).	Quito (Équateur).	
Kazan [2].	Mitidja.			
Podolie [2].	Tunis.			

1. Je tiens à remercier tous les savants qui se sont empressés de me les envoyer sur ma demande. Je suis surtout reconnaissant à M. Duclaux, à M. Cramer (Zurich), à M. Treub (Buitenzorg), à M. Cavalcanti (Campinas), pour leurs nombreux envois.

Les échantillons ont été prelevés à une profondeur de 10 centimètres environ et très soigneusement emballés dans des récipients bouchés hermétiquement et cachetés, de sorte que les poussières de l'air ne pouvaient y pénétrer pendant le trajet. On les ouvrait au laboratoire avec toutes les précautions nécessaires.

2. Ces deux dernières terres russes ont été étudiées bien avant les autres, excepté celles de Zurich, dans l'hiver 89-90. Je puis me dispenser d'en parler ici, en

Des cultures ensemencées par une trace de chacun de ces échantillons servirent de points de départ chacune pour une série de cultures-filles, que je désignerai brièvement par le nom de leur provenance. Toutes les conditions, pour toutes ces cultures, ont été maintenues constantes pendant tout le cours de ces expériences, et strictement égales pour toutes, à peu d'exceptions près. On les tenait à l'étuve à 30°.

J'ai suivi de très près la marche de la nitrification dans ces cultures, depuis les cultures-mères, ensemencées par la terre, jusqu'à la 7e génération. En les examinant aussi souvent que je le pouvais, et toujours exactement de la même manière, je notais la réaction ammoniacale (liqueur Nessler) et la réaction nitreuse (empois d'amidon ioduré) comme « maximum d'intensité », « faible » ou « nulle ». Pour déceler l'acide nitrique, on décomposait l'acide nitreux par ébullition avec du chlorhydrate d'ammoniaque en excès ou de l'urée, et on faisait agir la diphénylamine, ou on ajoutait de la poudre de zinc, quelques gouttes d'empois ioduré et d'acide sulfurique, et on secouait violemment dans une éprouvette bouchée à l'émeri.

Je me bornerai à extraire du protocole de ces expériences les détails nécessaires pour s'en faire une idée complète.

Les *cultures-mères* ne sont pas tout à fait comparables entre elles. L'état des terres employées comme semence était naturellement très différent : les unes fraîches, les autres longtemps conservées dans des flacons hermétiquement bouchés, trop sèches ou trop humides, etc. Pour être sûr d'un résultat positif, on en jetait quelquefois un à plusieurs grammes dans le liquide à ensemencer, tandis que pour les terres fraîches une trace suffisait. Tout cela peut expliquer les très grandes différences dans l'énergie du phénomène qu'on a constatées dans ces cultures-mères, et en rend les détails peu intéressants. La période, dite d'incubation, a varié, par exemple, de 3 à 20 jours. Mais en laissant de côté le temps qu'il a mis à s'accomplir, le phénomène a été partout sensiblement le même.

Il se déclarait par l'apparition de nitrite, dont la quantité

me contentant de dire que ces observations plus anciennes concordent en tous points avec celles de plus fraîche date. Des recherches moins suivies ont été faites avec plusieurs autres échantillons encore, que je passe sous silence.

augmentait d'abord rapidement, mais qui finissait par disparaître en se transformant en nitrate.

Voici quelques exemples.

L'un est exceptionnel : la terre *Quito* n'a mis que juste sept jours à accomplir la nitrification; la réaction nitreuse n'a pas même eu le temps d'atteindre son maximum d'intensité, qu'elle a commencé à décroître, et au bout de la semaine il n'en restait plus trace. Cette terre s'est tout de suite signalée entre toutes comme contenant un agent producteur de nitrate très puissant. Les autres ne l'ont pas suivie, même de loin : le même phénomène y a duré de 3 semaines à 40 jours.

Les deux exemples qui suivent peuvent être considérés comme des cas typiques :

1. Terre de Zurich. Ensemencement le 11 octobre en quantité de 1 gramme. Le 22 octobre, la réaction nitreuse atteint son maximum d'intensité, il n'y a plus d'ammoniaque. Le 29, elle est stationnaire : réaction de nitrate presque nulle. Le 1er novembre, la réaction nitreuse paraît décroître. On dose l'azote nitreux, qui est en proportion de :

10,2 pour 100,000.

Le 5 novembre, réaction de nitrate très intense.

Le 11 novembre, les nitrites ont disparu jusqu'à dernière trace.

2. Terre de Zurich. Ensemencement par une trace, le 11 octobre. Réaction nitreuse, le 3 novembre, peu intense; le 12 novembre, maximum d'intensité; le 24 novembre, stationnaire. L'ammoniaque fait défaut depuis le 20 novembre. L'azote nitreux a été dosé par titrage avec le permanganate et par la méthode colorimétrique avec la méta-phénylénediamine. Résultats moyens :

Le 24 novembre,	azotre nitreux	15	pour 100,000
Le 5 décembre,	—	11,4	—
Le 11 décembre.	—	8,8	—
Le 16 décembre,	—	0	—

Tout l'azote est devenu azote nitrique.

Il devient certain, d'après ces exemples, que les organismes nitrificateurs transplantés directement de leur milieu naturel dans un liquide facilement nitrifiable *produisent immédiatement de l'acide nitreux en abondance*. Le phénomène se divise nettement en deux périodes, dont la seconde, l'oxydation des nitrites, ne commence qu'après la disparition totale de l'ammoniaque; et encore son début, la première période terminée, se fait le plus

souvent attendre plusieurs jours. Plus rarement la formation et l'oxydation des nitrites paraissent marcher simultanément, mais jamais de pair, la seconde toujours sensiblement en arrière.

Je passe maintenant aux *cultures filles*.

J'ai cru bien faire, pour abréger, de traduire par des signes dans le tableau de la page 585 les notes de mon journal, d'un genre naturellement très uniforme, et j'ai choisi pour caractériser la marche des cultures la réaction de l'ammoniaque, *Am* du tableau, et la réaction de l'acide nitreux, *Ni* du tableau. J'ai mis + + là où je lisais dans mes notes « maximum d'intensité »; + où il y avait « réaction faible »; 0, réaction nulle. On comprendra, d'après ce qui a été dit plus haut sur la marche de l'oxydation, que, par exemple, *Am* 0, *Ni* + + signifie : ammoniaque disparue, transformée en acide nitreux; si on voit suivre *Ni* +, c'est que l'oxydation des nitrites est en train; *Ni* 0 — elle est terminée, tout l'azote a passé à l'état de nitrates. J'ai à peine besoin d'ajouter qu'on ne manquait pas alors de constater directement la présence d'acide nitrique ou de le doser dans les cas plus intéressants.

Je remarquerai encore que je n'ai pas pu mettre les premières cultures *Melbourne*, *Campinas*, *Quito* sous les mêmes dates, car elles n'ont pas été menées et examinées simultanément avec les autres, mais bien assez exactement dans les mêmes conditions. La première génération de *Campinas* commence pourtant avec la seconde des autres. Avec quelques-unes, on a cessé bientôt ces cultures parallèles, ayant acquis la certitude que le phénomène voulu, l'oxydation des nitrites, ne s'y laisserait plus constater. On considérait et on notait le résultat comme négatif, quand on ne remarquait pas de disparition de nitrite au bout de deux mois. Pour constater définitivement que ce phénomène n'est pas en train, on dosait le taux d'azote nitreux et on répétait ce dosage au bout de 8 à 10 jours. On a jugé inutile de continuer les expériences au delà de deux mois; parce que, d'abord, il faut s'en tenir à l'énergie du phénomène naturel et tâcher de l'imiter, et ensuite, parce qu'en prolongeant outre mesure l'expérience, d'autres influences peuvent entrer en jeu, qui n'ont rien à faire avec les questions qui nous intéressent.

ENCEMENCÉE LE	1re GÉNÉRATION 10 OCTOBRE 1890			2e GÉNÉRATION 6 NOVEMBRE 1890					3e GÉNÉRATION 3 déc. 1890		4e GÉNÉRATION 4 FÉVRIER 1891					5e GÉNÉRATION 12 MARS 1891				6e GÉNÉRATION, 21 AVRIL 1891				7e GÉNÉRATION 12 MAI 1891	
EXAMINÉE LE	20 OCT.	20 OCT.	7 NOV.	15 NOV.	15 NOV.	26 N.	26 NOV.	6 DÉC.	25 FÉ.	25 FÉV.	17 FÉV.	25 FÉ.	25	12 MARS	18 AVRIL	18 AVRIL	5 MAI	2 JUIN	23 JUIN	3 MAI	11 MAI	2 JUIN	23 JUIN	23 JUIN	10 JUIL.
Série :	Am.	Ni.	Ni.	Am.	Ni.	Am	Ni.	Ni.	Am.	Ni.	Ni.	Am.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.	Am.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.	Ni.
Zurich.....	0	++	++	0	++		++	++	0	++	++	0			++										
Gennevilliers..	0	++	++	0	++		++	++	0	++	++	0			++					0		++	++		
Java.....	0	++	++	++	+	0	++	++	0	++	++	0			++										
Japon.....	0	++	++	++	+	0	++	++	0	++	++	0			++										
Melbourne....				++	+	0	++	++	0	++	++	0			++					++	++	++	++		
La Reghaïa...	0	++	0	++	+	0	0		0	0	++	0	++	++	0	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
Rouïba.....	++	+	0	++	0	0	++	0	0	0	0	+	+	++	0	++	++	++	++	++	++	++	++		
Mitidja.....	++	+	0	++	0	0	++	0	0	0	0	+	+	++	++										
Tunis.....	+	++	0	++	0	0	+	0	0	0	++	0	++	0		++	++	0		+	++	++	++	++	++
Campinas									0	0	++	0	0			++	0	0		0	++	++	++	++	++
Quito.....				0	++		0		0	0	++	0	++	0		0		0		++	+	0	0	0	

Il importe, avant de discuter les observations que montre le tableau, de bien noter tout de suite un fait qui n'y a pas trouvé place : c'est qu'à la date de l'ensemencement de la première génération des cinq premières séries, leurs cultures-mères montraient une réaction nitreuse d'une intensité maximum ; tandis que pour les six dernières séries elle était ou minimum ou nulle.

Le tableau montre clairement ce que nous avons déjà noté chez les cultures-mères, que l'oxydation de l'ammoniaque ne se fait jamais d'emblée, mais que le nitrite est une étape nécessaire du phénomène. Il y aurait donc malentendu à parler d'une diminution ou d'un affaiblissement du *pouvoir oxydant* de nos microbes, l'oxydation de l'ammoniaque témoignant d'une énergie d'oxydation plus grande que l'oxydation du nitrite. Il n'y a donc lieu de parler dans ce qui suit que de la faculté d'oxyder les nitrites, qui persiste ou qui disparaît.

La disparition a été le résultat final dans tous les cas, moins un, mais la manière dont elle s'est faite a été différente. Elle a été brusque dans les séries : *Zurich*, *Gennevilliers*, *Java*, *Japon*, *Melbourne*. Cette fonction a persisté pendant plusieurs générations dans les séries : *La Réghaïa*, *Rouïba*, *Mitidja*, *Tunis*, *Campinas* et *Quito*. Dans celles-ci elle a paru faiblir graduellement avant de disparaître.

Ainsi il y aurait à première vue une différence marquée dans la manière dont se comportent les organismes nitrificateurs de différentes terres : chez ceux qui proviennent d'Europe, d'Asie, d'Australie, la fonction d'oxyder les nitrites est très éphémère, elle est beaucoup plus durable chez les ferments africains et américains. Mais l'influence fâcheuse de la culture dans le milieu liquide finit toujours par en avoir raison, et il n'y a que les organismes de la terre *Quito* qui ont résisté, s'étant montrés dès le début comme producteurs hors ligne de nitrates.

C'est là l'impression immédiate que font ces faits sur l'observateur, mais nous tâcherons de les analyser et de les contrôler par d'autres expériences pour en élucider le vrai sens.

Le point principal c'est justement cette influence fâcheuse du milieu liquide. En quoi consiste-t-elle? Et d'abord est-elle réelle ou apparente?

Pour répondre à cette question, il importait de voir si on pourrait réussir à imprimer à l'oxydation des nitrites une allure

plus vive et plus continue dans ce même milieu. Nous avons vu que cette fonction est surtout très lente à se déclarer, mais une fois en train, elle marche bien. Supprimons alors cette longue *période d'incubation*, en continuant l'expérience avec des cultures où la production des nitrates a été constatée. Celles-ci deviendront ainsi plus aisément comparables au milieu terre, d'autant que ce dernier est déjà donné comme siège d'une production active de nitrates.

Le petit tableau ci-dessous donne tous les détails d'une partie d'une expérience de ce genre. Des cultures ensemencées le 10 octobre ont été menées jusqu'à la fin de janvier en renouvelant les doses d'ammoniaque, non à mesure de la disparition de l'azote ammoniacal, mais à mesure de la disparition de l'azote nitreux. On donnait ainsi à l'oxydation le temps de devenir complète avant de recommencer à nouveau.

	7/11	8/11	10/11	12/11	12/11	14/11	15/11	21/11	21/11	24/11	24/11	25/11	25/11	26/11	5/12	6/12	11/12	11/12	12/12	12/12	14/12	22/12	RÉSULTAT FINAL
	Ni.		Ni.	Am	Ni.		Ni.	Ni.		Am Ni		Am	Ni.	Ni.		Ni.	Am	Ni.	Ni.		Ni.	Ni.	Az. nitrique.
Reghaïa....	0	4 mgr. de sulfate am.	++	0	0	4 mgr. de sulfate am.	+	0	4 mgr. de sulfate am.	0	4 mgr. de sulfate am.	0	0		40 mgr. de sulfate am.	++	0	+	0	40 mgr. de sulfate am.	++	0	$31^{mgr},9$
Rouïba....	0		+	0	0		+	0		0		0	++	0		+	0	++	0		++	0	$28^{mgr},8$
Mitidja....	0		+	+	+		+	0		0		0	++	0		+	0	++	0		++	0	non dosé
Tunis.....	0		+	0	0		+	0		0		0	0	0		++	0	0	0		++	0	$26^{mgr},3$

Ce régime s'est montré des plus efficaces. Un coup d'œil sur ce tableau montre que la production de nitrates, loin de s'affaiblir, devenait de plus en plus énergique, et finalement, surtout si les doses d'ammoniaque étaient relativement faibles, on ne remarquait même plus l'apparition de l'acide nitreux, mais toute l'ammoniaque ajoutée un jour se trouvait à l'examen suivant déjà transformée en acide nitrique. Voir par exemple : 21/11 et 24/11, 24/11 et 25/11. Pour constater l'apparition passagère de nitrites dans ces cultures, il fallait répéter l'examen d'heure en heure, où ajouter une dose plus forte de sel ammoniacal ; dans ce dernier cas la formation de fortes quantités d'acide nitreux après chaque nouvelle dose d'ammoniaque devenait de nouveau très frappante.

Voilà donc que nous avons réussi à provoquer dans notre milieu ordinaire une nitrification en tout point analogue au phénomène naturel. La production de nitrate aux dépens de l'ammoniaque y est devenue régulière et rapide, et ce n'est qu'à la facilité de contrôler le phénomène dans le milieu liquide que nous devons la constatation de la production intermédiaire de nitrite dans ce cas, comme dans les autres.

L'influence nocive du milieu liquide sur cette fonction est donc tout à fait illusoire, et c'est à tort qu'on l'a accusé de la réprimer. Ce ne sont pas les qualités physiques ou chimiques du milieu qui sont en jeu, mais évidemment des influences d'ordre biologique. Ces expériences ne permettent encore de rien préciser, mais en continuant l'analyse on pourra en tirer des indications utiles.

En comparant dans le tableau de la page 585 les circonstances qui accompagnent la disparition de cette fonction, nous trouvons que dans des séries où elle se maintenait, elle cesse dans une nouvelle génération, quand celle-ci provient directement d'une culture qui, au moment de la prise de semence, était encore très riche en nitrites. Nous avons déjà dit que la première génération des cinq premières séries a été ensemencée au moyen de cultures très riches en nitrite à ce moment; au contraire les premières générations des six dernières provenaient directement de cultures où la production de nitrates était très avancée; et nous voyons comme conséquence cette fonction déjà abolie dans les premières, lorsqu'elle est encore persistante dans les secondes.

Cette fois comme les autres on n'a pas eu l'idée d'attendre que l'oxydation eût atteint partout un degré équivalent; pourvu que la disparition totale de l'ammoniaque eût montré que la nitrification s'était bien poursuivie partout, une nouvelle génération était ensemencée au moyen de la plus récente, à des intervalles d'un mois en moyenne.

Il est arrivé ainsi finalement que les cultures *Reghaïa* et *Rouïba*, 5e génération; *Tunis*, 6e génération; *Campinas*, 7e génération, ont été ensemencées — le 12/3, le 21/4 et le 12/5, — au moyen de cultures de la précédente génération, qui donnaient à ce moment une réaction nitreuse au maximum (comparer les dates de l'examen, 12/3, 18/4 et 11/5), et dans

les nouvelles générations l'oxydation des nitrites n'a plus réapparu.

Pour résumer, la seule conclusion sûre que nous donnent ces observations est celle-ci : la cause immédiate de la suppression de la production des nitrates dans les cultures successives en milieu liquide est à chercher dans l'état de la culture-mère au moment de la prise de la semence, état duquel dépend la qualité de cette dernière.

II

Le résultat de ces observations sur la production de nitrate dans une culture mélangée est déjà difficilement compatible avec l'idée d'un seul ferment nitrificateur, dont la fonction se modifierait. Du même coup, toute idée qui verrait dans ce phénomène autre chose que l'action d'organismes est définitivement écartée sans qu'il soit nécessaire de la discuter.

Passons maintenant à la question de savoir si les ferments nitreux, ou devenus nitreux, si l'on veut, manifestent encore quelques vestiges d'un pouvoir oxydant sur les nitrites, et si ce pouvoir peut leur être restitué par des moyens appropriés.

Pour y répondre, on dosait le taux de l'azote nitreux dans les cultures, et on répétait, bien après la disparition totale de l'ammoniaque, les dosages à des intervalles de 7 à 20 jours. Quelques centimètres cubes suffisaient pour ce dosage, qui s'effectuait par titrage avec une solution de permanganate 1/100 normale, ou par la méthode colorimétrique avec la métaphénylène-diamine ; ou par les deux méthodes ensemble, en prenant la moyenne des résultats, quand il s'agissait de faire un dosage très exact.

Avant de faire ces dosages successifs, on attendait toujours de six semaines à deux mois pour donner amplement au phénomène le temps de se déclarer.

Le tableau ci-joint montre que dans aucun cas on n'a pu constater d'oxydation notable du nitrite formé.

SÉRIES	ZURICH					Gennevilliers		JAVA	unis	Reghaïa
CULTURES	A	B	C	D	E	A	B			
Azote nitreux pour 100.000	64.8	9.6	12.0	9.8	6.3	46.0	11.6	10.5	8.8	22.0
Au bout de 7 jours.....	63.6	»	»	»	6.5	45.5	»	»	»	»
» 10 »	»	»	»	9.5	»	»	»	10.9	8.9	22.4
» 11 »	»	»	11.9	»	»	»	12.8	»	»	»
» 13 »	»	10.1	»	»	»	»	»	»	»	»
» 20 »	»	»	»	»	9.5	»	»	»	»	»

S'il y a diminution du taux de l'azote nitreux, elle ne dépasse pas l'erreur possible des dosages. Dans la majorité des cas, il y a eu au contraire augmentation, ce qui s'explique facilement par l'augmentation de la concentration du liquide On comprend aisément que cette évaporation peut être plus abondante dans des vases avec bouchons de coton lâches, avec une surface de liquide plus grande, etc., tandis qu'elle est faible ou nulle dans des conditions inverses. Le résultat étant uniformément négatif, et concordant parfaitement avec ceux d'autres auteurs, de M. Warington en première ligne, on n'a pas multiplié ces expériences.

Une méthode encore plus simple donne des résultats tout aussi certains. Je faisais nitrifier une solution ammoniacale très faible, à 1 ou 2 pour 100,000 : la trace de nitrite qui en résultait persistait aussi longtemps que j'observais ces cultures, six à huit semaines.

Des tâtonnements ont été faits ensuite pour rechercher si quelques substances qui manquaient dans ma solution ordinaire, mais qui ne manquent jamais dans la terre, pourraient favoriser d'une manière ou d'autre cette oxydation J'ai pensé aux sels de fer et aux matières humiques.

Les sels ferriques ont été souvent regardés comme susceptibles de rendre leur oxygène aux corps facilement oxydables, et de servir ainsi d'intermédiaire à l'oxydation. L'addition aux cultures d'hydrate ferrique fraîchement précipité, et en excès, a été plusieurs fois essayé dans le cours de mes expériences de l'été 1890. L'effet en a été nul, et je n'en ai rien dit dans mon mémoire (N° 12, t. IV de ce recueil) qui s'occupe de cette période

de travail. Cette fois, j'ai essayé un sel ferreux, pour voir si l'oxydation simultanée d'un sel de fer et de l'ammoniaque ne pourrait avoir quelque effet nouveau. Au lieu de sulfate d'ammoniaque, on a donné à une culture une quantité équivalente de sulfate ferreux-ammoniacal. La nitrification alla aussi bien que toujours, mais l'effet, au point de vue qui nous intéresse, fut nul : voir l'expérience E du tableau de la page 590.

La culture dans un extrait alcalin d'une terre riche en humus, stérilisé et additionné de sulfate d'ammoniaque, n'a pas eu un meilleur résultat. (Voir le même tableau, exp. D.)

Des expériences plus suivies ont été faites spécialement pour rechercher si la culture sur milieu solide ne pourrait avoir pour résultat la restitution du pouvoir oxydant sur les nitrites. Contre la culture en milieu liquide, une objection pouvait encore subsister, à savoir que, dans des conditions naturelles, ces organismes vivent plutôt à l'air humide et non submergés dans un liquide, comme c'est le cas pour lesdites cultures. C'est là peut-être que serait la cause d'un changement dans leur action. Le bien fondé de cette objection ne saurait être nié d'avance. Il fallait des faits pour lui répondre.

Comme milieu solide on a employé :

1° Une gelée de silice, imprégnée de sel ammoniacal;

2° De la terre stérilisée.

On a cultivé sur silice gélatineuse[1] les organismes des terres *Zürich, Gennevilliers, Java, Japon*. On faisait les ensemencements, tantôt en prenant une gouttelette infinitésimale d'une culture liquide, et en l'étendant en stries sur la surface de la gelée déjà solide, tantôt en la mélangeant au milieu avant sa gélification. Dans l'un et dans l'autre cas, les colonies poussaient plutôt à la surface, et se trouvaient ainsi dans des conditions qui ne différaient en rien, au point de vue de l'accès de l'air, des conditions naturelles. En conservant les boîtes Petri, qui servaient à ces cultures, dans de grandes chambres humides, la dessiccation de la gelée pouvait être aisément évitée pendant de longs mois. De temps en temps on y prélevait des morceaux de gelée, gros comme un pois, et on les jetait dans de petites coupes contenant 2cc du réactif iodamylique.

Douze plaques ont été encemencées dans l'intervalle du 15 au 30 décembre. L'expérience a duré jusqu'au 5 mai.

Les résultats de la culture sur silice peuvent être résumés

1. Voir sa composition, t. V, n° 2 de ce recueil.

en quelques mots. La réaction nitreuse apparaît dans les premiers jours : au bout de 7 à 12 jours elle atteint son maximum d'intensité[1], elle reste stationnaire aussi longtemps que dure l'expérience.

D'autres expériences de culture sur le même milieu, très nombreuses, faites dans le but d'isoler les organismes nitrificateurs, sont venues ensuite confirmer ce résultat. Plusieurs perfectionnements ont été apportés à la méthode, la composition du milieu a beaucoup varié, les cultures sont devenues plus luxuriantes; mais rien n'a changé quant à la production et à la constance des nitrites.

Comme tout à fait décisives dans cette question, je regarde mes expériences avec la terre. Je les expose en détail dans le chapitre VI de ce mémoire. Ici j'en donnerai seulement le résultat : *de la terre stérilisée et ensemencée par une culture pure d'un ferment nitreux ne produit que des nitrites, et ceux-ci y sont tout aussi stables que dans le milieu liquide*[2].

III

Nous sommes maintenant sur le point d'admettre que les causes de l'oxydation de l'ammoniaque d'un côté, de l'oxydation des nitrites de l'autre, sont différentes. Nous ne doutons plus du tout que cette dernière ne soit due à des organismes, et il nous paraît déjà maintenant peu probable que ce soient des espèces banales qui le produisent. La question est seulement de savoir, si cette fonction est spécifique à un degré aussi complet que celle d'oxyder l'ammoniaque, ou si elle est plus ou moins répandue dans le monde des microbes. L'étude des organismes peuplant mes cultures devait répondre. Elle fut entreprise et étendue à la fois toutes les séries de culture de provenance

1. Le morceau de gelée jetée dans le réactif devient momentanément noir, et le liquide qui le baigne d'un bleu opaque.

2. Les ferments nitreux étant sans action sur le nitrite une fois formé, il faudrait admettre que le peu de nitrate, qu'on trouve toujours dans leurs cultures complètement pures, se formerait en même temps que le nitrite aux dépens de l'azote ammoniacal. Il y a pourtant plusieurs incertitudes à lever, dues surtout à l'imperfection des méthodes d'analyse, et je n'entrerai pas ici dans une discussion sur ce sujet, en me réservant d'y revenir.

différente, dont nous nous sommes occupé dans le chapitre I de ce mémoire.

Cette étude a porté d'un côté sur la recherche d'organismes nitrificateurs à fonctions analogues à ceux qu'on connaît, c'est-à dire de *ferments nitreux;* de l'autre, sur la recherche d'organismes capables de produire des nitrates au dépens de nitrites — *de ferments nitriques.*

Je commencerai par exposer brièvement la partie du travail qui se rapporte à la première de ces deux tâches.

Elle a été naturellement très facilitée par mes recherches antérieures; il n'y avait qu'à appliquer les mêmes méthodes. Quant au résultat, il se laissait prévoir, et moi-même je l'ai prédit dans les conclusions de mon premier mémoire sur la nitrification. Il était cependant attrayant d'étendre ces recherches à des terres provenant de toutes les parties du monde. La nitrification, phénomène universel, grandement indépendant de toute condition locale, mérite bien d'être étudié comme tel.

On avait au premier abord une certaine satisfaction à constater que tous ces organismes, de quelque provenance qu'ils soient, appartiennent tous au *type physiologique* dont j'ai précisé les traits généraux. Un sel ammoniacal et un carbonate, outre des traces de sels nutritifs ordinaires, dans l'eau distillée, réalisent leurs meilleures conditions d'existence.

Les caractères extérieurs de leurs cultures ne différaient en rien aussitôt qu'ils devenaient constants, c'est-à-dire, aussitôt que l'épuration par cultures successives avait atteint un certain degré. Le liquide restait la plupart du temps limpide; mais, à un moment donné, on remarquait, au moins très souvent, un trouble assez prononcé, mais passager, après quoi la couche du carbonate au fond des vases prenait cet aspect gélatineux et floconneux que j'ai signalé.

L'étude microscopique souvent répétée de ces cultures a donné des indications très précises.

D'abord quelques mots sur la méthode de préparation dont on s'est servi. Une trace du dépôt était étendue sur une lame couvre-objet et séchée comme d'ordinaire. On ajoutait alors une goutte d'une solution très étendue, tout à fait transparente, de vert de malachite; au bout d'une demi-minute à peine, on lavait et on colorait par une solution également très faible de

gentiane, qu'on laissait agir pas plus longtemps. La coloration des cellules est alors très nette et intense sur un fond tout à fait incolore [1].

En examinant d'après cette méthode les cultures où il n'y avait constamment que production de nitrite, ainsi que celles où le nitrite accumulé ne montrait encore aucune tendance à disparaître, on voyait les parcelles du carbonate couvertes de groupes épars et de zooglées massives, composés de cellules sans aucun doute identiques. Par leurs formes rondes ou arrondies, par leur grandeur relative, mais autant encore par leur quantité et leur uniformité, elles tranchaient au premier coup d'œil sur d'autres végétations, qui étaient le plus souvent ou des formes nettement bacillaires (avec spores), ou des bâtonnets minuscules. Sauf des bouts de mycélium, provenant des petits *Oïdium* du sol, on n'y découvrait rien de plus au microscope. Toutes ces dernières formes ne se trouvaient généralement qu'à la surface du liquide, formant une sorte de voile si léger qu'on ne le distinguait à l'œil nu que dans des cultures âgées de plusieurs semaines.

Je n'ai jamais hésité à admettre que ces masses zoogléiques appartenaient aux *ferments nitreux*, ce qui s'est confirmé chaque fois. Depuis, j'ai eu le temps d'en isoler quelques-uns, notamment ceux des terres *Gennevilliers*, *Java*, *Melbourne* et *Quito*, et de m'assurer qu'ils le sont vraiment. Cette constatation présentait un intérêt particulier pour la terre *Quito*. On se rappelle que la production de nitrates s'est montrée très persistante dans les cultures de cette origine; il est démontré à présent que cette terre contient aussi un ferment nitreux qui, en cette qualité, ne diffère pas des autres.

Quant à la morphologie de tous ces organismes, elle ne se laisse pas faire en quelques mots, et je me trouve obligé, de crainte de prolonger outre mesure ce mémoire, de la remettre à

1. Il n'en est pas de même si on fait agir d'autres colorants additionnés de mordants, de l'huile d'aniline, d'alcali, etc. La coloration avec la fuchsine à l'eau anilinée est très belle, mais il est difficile d'éviter que la matière colorante se précipite sur les particules de la base, ou que la matière gélatineuse prenne une coloration trop intense. Des lavages à l'alcool n'ont pas toujours le résultat voulu. La coloration avec de simples solutions de fuchsine, de gentiane, de bleu de méthylène, surtout avec ce dernier, est lente et ne donne pas de belles préparations.

plus tard[1]. Je ne donne ici qu'un court résumé des résultats principaux.

Chaque terre ne possède jamais qu'une seule espèce ayant la fonction d'oxyder l'ammoniaque.

Les terres de localités non éloignées contiennent, comme on pouvait le prévoir, une seule et même espèce de ferment nitreux.

Au contraire, les différences morphologiques sont plus ou moins marquées entre les organismes provenant de pays très éloignés, même quand ils ne sont pas séparés par la mer.

Quelquefois ce n'est qu'une différence de taille, mais qui se maintient tout à fait constante ; quelquefois, les caractères distinctifs sont plus saillants, de sorte qu'il faudra distinguer probablement quelques espèces ou même des genres, selon le principe de la classification.

IV

Je passe à mes recherches d'un organisme producteur de nitrate.

Elles ont été commencées en même temps que celles dont nous venons de parler, par une étude microscopique des cultures, mais ici on choisissait naturellement celles d'entre elles où une oxydation énergique de nitrites se poursuivait. On a pris notamment les cultures *Tunis* et *Reghaïa* du tableau de la page 585, en espérant de tirer quelques indications de la comparaison de leurs organismes avec ceux des cultures de même origine, mais encore en pleine période nitreuse.

A la date du 6 décembre 1890, je trouve dans mon journal se rapportant à ladite culture série *Tunis*, la note suivante : « A côté de masses zoogléiques d'un *coccus*, végétation très riche d'une bactérie, exceptionnellement petite, tantôt assez régulièrement ovale, tantôt en forme de bâtonnets irréguliers, formant le plus souvent de petits groupes denses mais aplatis. » Mon attention

1. Les observations morphologiques faites au commencement sur un matériel impur ont été répétées ensuite sur un matériel épuré, et finalement avec des cultures complètement pures. Je possède maintenant une grande collection de photographies de tous ces organismes dans leurs différents stades de développement. Je les livrerai à la publicité aussi vite qu'il me sera possible.

fut immédiatement attirée par cet organisme, et des tentatives d'isolement entreprises.

Pour comprendre la direction qu'ont prise alors mes expériences, il faut dire que les causes de la disparition de la production de nitrate dans les cultures successives m'était encore tout à fait obscure, et je tâchais de me faire une idée là-dessus. Il me parut alors probable que cette cause résidait dans le manque de substance organique dans ces cultures. J'ai si souvent suivi la disparition de microbes banaux, présents comme impureté dans mes cultures, à cause de leur manque en substance organique, que je pensais que dans ce cas il pourrait bien en être ainsi. Cette supposition était en divergence avec ma propre expérience, assez longue, des organismes oxydant les substances inorganiques, mais je ne trouvais pas en ce moment d'autre explication satisfaisante du fait qui m'intéressait.

J'ai cru par conséquent devoir employer, pour isoler ce ferment, des milieux solides comme ceux qu'on emploie ordinairement. Je me suis servi :

De la gélatine nutritive ordinaire;
D'une solution ammoniacale à base de gélatine;
De la même à base de gélose;
D'urine gélatinisée par la silice;
D'une infusion de foin gélatinisée par la silice.

En faisant ces cultures surtout sur gélatine ordinaire, on avait soin de préserver les plaques de l'altération aussi longtemps que possible; on y arrivait par un ensemencement très pauvre. On s'attachait ensuite à isoler de toutes les colonies celles qui apparaissaient le plus tard et qui poussaient le plus lentement. C'est qu'on croyait que ce ferment, tout en exigeant du carbone organique pour sa croissance, n'a pas sur ces milieux l'allure des espèces dont la décomposition de la matière organique est la seule fonction.

J'ai commencé par isoler cinq espèces provenant de la série *Tunis*, auxquelles est venue se joindre une sixième, des plus lentes dans sa croissance sur ces milieux. Outre ces six formes, rien autre chose n'y poussait. De la série *Reghaïa* on n'a choisi que deux espèces de croissance fort lente, en laissant les autres de côté. Pour essayer si ces espèces avaient le pouvoir d'oxyder les

nitrites, des ensemencements ont été faits dans des milieux liquides, qui étaient :

Des cultures anciennes des ferments nitreux, stérilisées par ébullition;

Le même liquide, additionné de quelques gouttes, jusqu'à 1/2^{cc}, d'infusion de foin ;

Une infusion de terre végétale stérilisée à l'autoclave et additionnée de nitrites et d'un peu de phosphate de potasse.

Toutes ces expériences ont donné un résultat absolument négatif. On les a gardées 60 jours en observation, et on n'a constaté nulle part de disparition de nitrite. Cependant, dans les cultures de la dernière catégorie, le liquide n'en contenait que des traces.

Ces échecs ont eu pour résultat de montrer que la faculté d'oxyder l'acide nitreux n'est nullement répandue parmi les microbes. Elles ont montré de plus que c'est un trait évidemment commun à tous ces organismes oxydants, que de se refuser à vivre sur des milieux solides, chargés de matière organique.

Une nouvelle période de recherches plus fructueuses date du commencement de cultures successives dans des liquides additionnés de nitrite de potasse, mais dont l'ammoniaque était exclue. Comme point de départ de ces séries, les cultures *Quito*, *Tunis*, *Reghaïa* 5e génération, ont été choisies.

Ici, je le dirai tout de suite, nous allons voir se confirmer ce que nous avons dit de la qualité de la semence, prise en pleine période nitreuse du phénomène. L'ensemencement s'est fait le 27 avril; les deux dernières cultures donnaient alors une réaction nitreuse très intense (voir le tableau de la page 585 sous 18/4 et 5/5). Depuis, la culture *Tunis* 5e génération, a fini par oxyder son nitrite (voir le tableau à la date du 2/6); mais les cultures de la nouvelle série *Tunis*, ainsi que de *Reghaïa*, n'ont jamais donné lieu à ce phénomène : la semence ne contenait pas l'organisme spécifique.

Au contraire, cette oxydation prit tout de suite un cours régulier dans la nouvelle série *Quito*. Nous avons vu qu'en présence de l'ammoniaque le phénomène ne débutait lentement qu'après la disparition totale de ce corps, dont la présence entravait évidemment sa marche. Ici ce retard ne se faisait plus sentir, et la production de nitrate était, par conséquent, beau-

coup plus rapide : au lieu de 3 semaines au minimum, 10 à 14 jours pour la même quantité.

Je remarquerai en passant que l'oxydation était toujours si complète, que même un réactif d'une sensibilité aussi exagérée qu'une solution d'acide sulfanilique avec de la naphtylamine, acidulée d'acide acétique, ne décelait plus la moindre trace d'acide nitreux.

Ces observations m'ont révélé tout de suite que pour qu'une production de nitrate puisse se poursuivre sans entraves, les ferments nitreux doivent être tenus soigneusement à l'écart : car on ne pouvait évidemment attribuer au sel ammoniacal lui-même, à dose si faible, aucune influence en ce sens. Pas d'ammoniaque alors, qui est le corps de prédilection de ces organismes, mais rien que du nitrite dès le début : jeter un peu de terre dans une solution de nitrite serait assurément le chemin le plus direct pour se procurer le ferment nitrique, et continuer les cultures successives dans le même milieu un moyen efficace pour l'épurer. Le ferment nitreux ne pourra se maintenir dans ces conditions, et les microbes de ces cultures devront se montrer finalement incapables de produire de l'acide nitreux aux dépens de l'ammoniaque.

Toutes ces prévisions se sont pleinement réalisées .

De la terre fraîche de *Zurich* et de la terre de *Java* ont été introduites dans une solution minérale, additionnée de nitrite de potasse correspondant à la dose de 22 milligrammes d'acide nitreux pour chaque vase. Au bout de 14 jours, le nitrite avait disparu dans la première des deux cultures; il a persisté plus longtemps dans la seconde. De ces cultures-mères, deux nouvelles séries : *Zurich* et *Java*, furent commencées, mais ce n'est que la première des deux qu'on a surveillée attentivement. L'oxydation du nitrite prit tout de suite un cours régulier dans les deux.

Ces cultures *Zurich* furent soumises à une étude microscopique soigneuse. Jamais je n'ai réussi à y constater la présence du ferment nitreux de cette terre, que je connais depuis si longtemps. Ceci est encore une preuve à ajouter à celles que nous avons données, de l'impuissance du ferment nitreux à oxyder le nitrite : cette substance n'est pas propre à soutenir sa végétation.

Pour s'assurer de son absence, le liquide ammoniacal ordinairement employé pour la culture des ferments nitreux fut ensemencé au moyen de l'une de ces cultures, troisième génération. Sur une plus grande échelle, ces expériences ont été ensuite répétées avec une culture épurée de la nouvelle série *Quito*. Aucune de ces cultures n'a nitrifié; au bout de deux mois, il n'y avait ni nitrites ni nitrates.

En l'absence des ferments nitreux, aucune nitrification n'a donc lieu, *les ferments nitriques étant totalement dépourvus d'action sur l'ammoniaque.*

L'élimination des ferments nitreux des cultures en solution de nitrite est même plus facile que l'élimination des ferments nitriques des cultures en liquide ammoniacal. Ceci n'est pas difficile à comprendre, l'absence de l'ammoniaque supprimant d'un coup tout développement des ferments nitreux, tandis que l'élimination du ferment nitrique n'est due qu'à des influences qui l'entravent, qui retardent son développement, mais qui, en somme, préparent un milieu qui lui est favorable.

La preuve que le phénomène de nitrification se compose de deux périodes distinctes : la *période nitreuse* et la *période nitrique*, et que chacune s'accomplit sous l'influence d'organismes distincts, est dès maintenant complète et irréfutable. Reste encore à faire connaître un ferment nitrique.

V

J'ai choisi le ferment nitrique sud-américain, dont l'étude était déjà à ce moment plus avancée; et puis l'énergie de son action était, sans aucun doute, supérieure à celle des autres, ce qui rendait son étude plus intéressante. Je continuais à le cultiver tantôt dans le liquide de culture stérilisé des ferments nitreux, tantôt dans une infusion de terre, finalement dans une solution de sels minéraux, toujours naturellement additionnée de nitrite. On ne remarquait aucune différence dans la rapidité du phénomène. Pour en finir avec la question de savoir si un peu de substance organique favorise l'action de cet organisme, des expériences spéciales ont été exécutées.

Cinq grands matras coniques à fond plat reçurent chacun 40cc d'eau distillée additionnée, comme d'habitude, de phosphate, etc., et de nitrite de potasse, dont la quantité, dosée par le permanganate, correspondait à 21,6 milligrammes d'acide nitreux pour chaque vase. Tous furent additionnés d'un peu de carbonate de magnésie. Deux d'entre eux, A et A′, reçurent en outre un demi-centimètre cube d'une infusion de foin, les deux autres, B et B′, ne furent additionnés d'aucune substance organique. Quatre d'entre eux furent ensemencés avec une culture de la nouvelle série *Quito*, le cinquième resta non ensemencé comme contrôle. Le tableau ci-joint donne tous les détails de la marche de ces cultures.

	12/5	30/5	5/6	9/6	12/6	12/6	18/6	18/6		27/6	27/6	29/6	29/6	30/6	1/7	2/7	4/7	7/7	10/7
Culture A.	Acide nitreux 21mgr,6	0	136 milligrammes.		0	136 milligrammes.	0	136 milligrammes.	Interruption.	0	136 milligrammes.	0	136 milligrammes.	+	0	154 milligrammes.	0	72 milligrammes.	0
» A′.		0		++	0		0			0		0		+	0		0		0
» B.		0			0		0			0		0		+	0		0		0
» B′.		0		++	0		0			0		0		+	0		0		0
Contrôle.		++			++		—		—	++		—		—	—		—		++

On voit que la présence de matières organiques dans le genre de celles que ces organismes trouvent aisément dans la nature leur est indifférente, à en juger parce que l'énergie de leur action ne s'en ressent pas. Cette expérience donne en même temps un bon exemple de l'allure vive que prend le phénomène quand l'ammoniaque avec ses ferments est exclue.

J'ai réussi facilement à cultiver ce ferment nitrique sur les milieux solides. Comme tel, j'ai employé un liquide de culture de ferment nitreux, concentré par ébullition jusqu'à 1/3 de son volume, et gélatinisé par deux fois son volume de solution silicique.

Le 27 avril, j'ai ensemencé une plaque, en y délayant une gouttelette de culture. Le 5 mai je vis apparaître, rien que sur la surface, de toutes petites colonies, qui me parurent appartenir à un petit *oïdium* du genre de ceux qu'on trouve très souvent dans le sol. Un morceau de gelée, jeté dans le réactif iodamylique, donna une réaction très intense. Néanmoins, on inocula cet organisme dans quatre vases, contenant la solution de nitrite ordinaire, additionnée ou non d'infusion de foin : dans tous, la *réaction nitreuse persista indéfiniment.* Aussi fut-on étonné de constater, le 1er juin, que la gelée de la plaque n'en donnait plus trace. En examinant celle-ci de nou-

veau au microscope, on constata que d'autres colonies beaucoup plus grandes avaient poussé dans l'intérieur de la gelée, tandis que celles qui ont apparu les premières sont restées toutes petites. Ces nouvelles colonies, d'un jaune grisâtre, n'étaient pas sphériques de forme, mais plutôt lenticulaires, lamelliformes, souvent un peu recourbées en tous sens, et se présentaient, tantôt plus ou moins de face, tantôt de profil, ce qui donnait à leur ensemble un aspect peu habituel. Le 13 juin, quatre matras furent ensemencés avec ces colonies. Le 22, deux ne contenaient plus de nitrite, auxquels un troisième est venu bientôt se joindre; dans le quatrième le phénomène n'a pas eu lieu.

Le premier essai avec ce milieu a tout de suite conduit au but, et un ferment producteur de nitrate était isolé. C'était l'unique espèce de cette terre qui fut douée de cette fonction; celle-ci s'est donc montrée au même degré spécifique que dans le cas des ferments nitreux.

Les cultures de cet organisme en milieu liquide méritent à peine la désignation de *culture*, l'œil nu n'y découvrant généralement aucune espèce de végétation: le liquide est clair, la surface est pure de tout voile, aucun flocon au fond. En séchant des gouttelettes du liquide et en colorant comme d'ordinaire, on y voit si peu de chose, en fait d'organismes, qu'on se refuse à croire que ces quelques petits bâtonnets puissent exercer une action appréciable quelconque. Quelquefois on ne parvenait à y découvrir presque rien, de sorte que l'examen chimique et l'examen microscopique paraissaient en contradiction flagrante : d'un côté action très notable, même énergique; de l'autre pas d'organismes.

J'ai réussi enfin à les trouver. En les cultivant dans un liquide très limpide je remarquai, — par comparaison avec des vases de contrôle, — que le fond des vases de culture se couvrait d'un enduit gélatineux très transparent, qui communiquait au verre une teinte gris bleuâtre extrêmement faible. En penchant le vase, je grattai le fond par le bout d'un tube capillaire filiforme, fraîchement étiré; des flocons minuscules sont montés dans le tube avec un peu de liquide, tandis que l'enduit qui couvrait le fond laissait voir nettement des stries aux endroits où le bout du tube avait passé. Séchés et colorés comme d'ordinaire, ces flocons se sont montrés au microscope comme composés exclusivement par des masses d'un organisme d'une petitesse extrême.

Cet enduit gélatineux adhère si fortement aux parois du vase, qu'on peut rincer ce dernier des dizaines de fois par de très grandes quantités d'eau, sans parvenir à l'éloigner. Ceci peut être utilisé même comme un moyen très simple pour épurer un peu cet organisme, pour éliminer notamment une autre petite bactérie, dont on trouve souvent les bâtonnets, éparpillés sur la surface du liquide.

Dans des cultures anciennes enfin, âgées de cinq à six semaines au moins, et qu'on a soutenues par de nouvelles doses de nitrites, on distingue nettement une pellicule extrêmement transparente, qui habille le fond des vases. En agitant le liquide, des petits bouts s'en détachent qui nagent dans le liquide. Avec un peu de patience on réussit à en attraper et à en faire des préparations colorées. C'est celles-ci, qui montrent les cellules de l'organisme dans leur connexion naturelle, qui sont les plus instructives.

Je n'ai pas réussi du premier coup à en faire de bonnes préparations. Les cellules retiennent faiblement la couleur, elles ont de plus la tendance à se colorer inégalement; la décoloration de la matière gélatineuse, qui les englobe par lavage, n'étant pas encore complète, il en résulte des tableaux microscopiques très peu clairs et impossibles à interpréter.

Je suis arrivé à avoir de bonnes préparations, en faisant agir le vert de malachite et la gentiane, comme je l'ai indiqué plus haut, et en colorant encore en troisième lieu à chaud par la fuchsine à l'eau d'aniline ; on lave ensuite à l'eau chaude à 50-60°, ce qui enlève presque la coloration à la matière gélatineuse, et les cellules se présentent alors très nettement, quoique assez peu intensement colorées en rouge violet sur un fond rose.

Le photogramme (Pl. XVIII fig. I) donne une très bonne idée de leur mode de végétation et de leur forme. Il représente un morceau de cette pellicule dont on distingue très bien les contours. On y voit les cellules réunies par une membrane gélatineuse et groupées en petits amas denses composés souvent d'une seule couche de cellules. La forme des cellules est toujours allongée, mais rarement régulièrement cylindrique ou ovale. Elle est plutôt pyriforme, le bout rétréci quelquefois allongé en sorte de petit bec recourbé. Leur longueur moyenne ne dépasse pas un demi-micromillimètre; leur épaisseur, variant beaucoup dans une seule et même cellule, est 3/2 à 2 fois plus petite.

J'ai joint, pour permettre une comparaison, une photographie (fig. 2) du *ferment nitreux* de la même terre sud-américaine. La préparation a été obtenue en pressant une lamelle sur une vieille culture sur silice, déjà devenue un peu impure. Dans une culture plus jeune en solution ammoniacale les cellules paraissent encore plus grandes.

La différence dans la forme des cellules des deux ferments est, on le voit, très marquée, et, en y joignant encore celle de leur mode de végétation, leurs caractères distinctifs sont aussi suffisants qu'on peut le désirer pour des microbes.

Ceci se rapporte aussi bien aux deux autres terres que j'ai étudiées : on distingue facilement ces deux organismes l'un de l'autre par leurs caractères morphologiques. Dans les cultures, les ferments correspondants se comportent aussi de la même manière.

J'ai tâché de donner une caractéristique aussi complète de ce nouvel organisme que je l'ai pu. Il sera très difficile d'aller plus loin dans l'étude de ses propriétés morphologiques et physiologiques. Une question très importante, on l'a remarqué, n'a pas reçu de réponse directe : c'est celle de savoir si cet organisme est capable d'assimiler le carbone de l'acide carbonique ou des carbonates. On conçoit que la démonstration exacte de ce fait présente d'autant plus de difficultés que les phénomènes de synthèse de la substance organique sont plus faibles. Ils sont très sensibles dans le cas des ferments nitreux, qui présentent une énergie de végétation et d'action beaucoup plus grande que ce nouvel organisme. Ils doivent être tout à fait insignifiants chez ce dernier, à tel point, nous l'avons vu, qu'il est même difficile de le découvrir dans le milieu où il exerce pourtant une action très notable. Mais malgré l'absence d'une démonstration rigoureuse du fait, je crois qu'on penchera à admettre, par analogie, que la nutrition carbonée de ce nouveau groupe ne diffère pas essentiellement de celle des ferments nitreux; surtout en songeant que les substances organiques n'ont, ici comme là, aucune influence favorable sur leur action et leur multiplication.

La *qualité ferment* chez ce microbe est des plus marquées, elle est exceptionnelle. Le pouvoir oxydant de cette quantité impondérable de substance vivante est étonnant; mais en jugeant l'or-

ganisme au point de vue de l'énergie de son processus vital, nous lui assignerions une place au plus bas de l'échelle des êtres vivants.

VI

Je passe maintenant à mes expériences de nitrification dans le *milieu terre*.

Elles ont été conduites à plusieurs reprises, en même temps que toutes celles que je viens de décrire, dans le but :

1° De rechercher si les ferments nitreux se comportent dans ce milieu de la même manière que dans les cultures en solutions minérales, au point de vue des produits de leur action.

2° De comparer la production des nitrates dans le milieu liquide au même phénomène quand il se fait dans le sol.

I. De la terre, prise dans un petit parc au voisinage du laboratoire, a été débarrassée de pierres et de débris végétaux et ameublie, autant que cela se pouvait, à l'état frais. Elle a été distribuée immédiatement à raison de 800 grammes dans deux grandes boîtes de verre (formées chacune de deux cristallisoirs d'inégale grandeur entrant l'un dans l'autre). L'une A, a été mise de côté; l'autre B, fermée et bien liée par un cordon, a été descendue dans l'appareil de stérilisation de Koch, où on l'a soumise à l'action d'un courant de vapeur durant 2 heures à 2 heures et demie; ceci a été répété 3 fois pendant 3 jours successifs.

Le 13 novembre 1890, on les arrosa chacune par 50cc d'eau distillée contenant 500 mgr. de sulfate d'ammoniaque en dissolution. La terre B a été ensuite ensemencée de la manière suivante : une culture du ferment nitreux (de Zürich) a été filtrée sur un tampon d'amiante; celui-ci, très bien lavé, a été repris et jeté dans un petit ballon, contenant quelques centimètres cubes d'eau. Après l'avoir bien agité là dedans, on a laissé tomber goutte à goutte le liquide trouble, avec les flocons d'amiante, à plusieurs endroits de la terre *B*. Le tout a été fait, cela va sans dire, avec toutes les précautions usuelles.

Les deux vases ont été tenus à 20°. De temps en temps on y prélevait des échantillons, et on en extrayait, sur des portions égales, les sels solubles par lavage sur filtre.

Le 23 novembre, la nitrification est déjà très avancée dans A. L'extrait contient des quantités considérables de nitrate, mais la réaction nitreuse est à peine perceptible, même en faisant agir l'acide sulfanilique et la naphtylamine. Dans B, la nitrification est peu avancée, mais l'extrait donne déjà une réaction nitreuse très sensible.

Le 4 décembre cette différence est déjà des plus accentuées. La réaction nitreuse de l'extrait B est au maximum d'intensité, dans A elle est absolument nulle.

Bientôt on constate, par l'ensemencement d'une trace de la terre B dans le bouillon, qu'elle est loin de contenir le ferment nitreux à l'état pur. Soit que la stérilisation n'ait pas suffi, soit qu'une infection ultérieure ait eu lieu, elle est peuplée par des quantités très grandes de différents bacilles à spores. L'expérience continue néanmoins et le résultat noté le 4 décembre ne change pas.

Le 13 février 91, après avoir bien mélangé les deux terres un peu humides encore, on dose l'eau, l'azote nitreux et l'azote nitrique.

Rapportée à 100 grammes de terre séchée à 100° l'analyse a donné :

	Azote nitreux.	Azote nitrique.
	mgrs.	mgrs.
A.	nul	17.9
B.	17.5	non dosable.

II. Cette série d'expériences a été commencée le 10 mai. La même terre est distribuée par portions beaucoup plus petites dans des matras coniques à fond plat et large goulot, bouchés par du coton.

Ceux désignés par des majuscules sont plus grands, — diamètre du fond 12 centimètres, — et contiennent 102 grammes de terre fraîche. Les huit autres sont plus petits, — 5 centimètres de diamètre de fond, — et ne contiennent que 25 grammes de la même terre. Douze vases ainsi chargés sont divisés en trois lots. Ceux de chaque lot sont en tout pareils et tenus exactement dans les mêmes conditions, tandis que ces conditions varient un peu de lot en lot.

Les deux lots : *a*, *b*, *c*, *d*, et *a'*, *b'*, *c'*, *d'*, sont tenus à l'étuve à 30°, leur terre est peu humide et a une épaisseur d'environ 2 centimètres. Les vases du troisième lot A, B, C, D, sont tenus à 22°-23°, l'humidité de la terre est plus grande, mais sa couche moins épaisse.

De ces trois lots les vases :

a, *a'*, A, contiennent de la terre à l'état naturel, comme contrôle.

b, *b'*, B, de la terre stérilisée à l'autoclave à 135° et ensemencée par une goutte de culture du ferment nitreux (de Zurich).

c, *c'*, C, de la terre stérilisée de la même manière et ensemencée par une trace de la même terre à l'état naturel.

d, *d'*, D, de la terre stérilisée comme les autres et ensemencée par une goutte de culture du ferment nitreux (de Zurich) et du ferment nitrique (de Quito).

Après la stérilisation, les 8 petits vases reçoivent tous la même quantité de 2cc d'une solution de sulfate d'ammoniaque, les 4 grands 6cc de la même solution [1].

1. On a omis de noter exactement la dose d'ammoniaque ajoutée. La solution faite à l'origine à 2 0/0 de sulfate était devenue plus concentrée après plusieurs stérilisations, de sorte que la dose dépassait 40 mgr. de sulfate pour les petits vases, 60 pour les grands. Cet oubli n'est d'ailleurs d'aucune importance, parce que dans des expériences de ce genre on ne retrouve jamais la totalité de l'azote du début de l'expérience, et l'interprétation d'une perte est tout à fait incertaine pour beaucoup de raisons. Il suffit que la dose d'ammoniaque soit égale dans des expériences parallèles et qu'elle ne soit pas excessive.

Pour finir l'expérience, on jetait tout le contenu d'un vase sur un filtre et on lavait, par aspiration, avec de l'eau froide, jusqu'à ce qu'une goutte d'eau de lavage ne donnât plus de bleuissement avec la diphénylamine.

1er *lot*. L'expérience finit le 9 juin. La terre est trouvée complètement sèche [1]. L'analyse des extraits a donné le résultat suivant :

	Réaction nitreuse.	R. nitrique.	R. ammoniacale.
a'.	nulle	intense	sensible
b'.	intense	trace	intense
c'.	faible	trace	très intense
d'.	trace	intense	intense

La nitrification est donc loin d'être terminée; elle a été évidemment interrompue par la dessiccation du milieu.

On dose l'acide nitreux dans l'extrait *b'* par le permanganate et par la métaphénylène-diamine. Résultat moyen :

Acide nitreux	6,5	mgrs
soit azote	2,3	»

On dose les traces d'acide nitreux dans l'extrait *d'* par la méthode colorimétrique avec la métaphénylène-diamine.

Acide nitreux	0,3	mgrs
ou azote.	0,11	»

2e *lot*. Les terres trouvées sèches le 9 juin, ont été arrosées par des quantités égales d'eau distillée. L'expérience finit le 3 juillet.

Le dosage des extraits a donné :

	Az. nitreux mgr.	Az. nitrique mgr.	Az. ammon. mgr.
a	0,5	15,9	nul
b	2,8	non dosable	7.4
c	8,5	1,3	2,6
d	nul	5.0	5,5

La nitrification entravée par la sécheresse n'a repris que très lentement et est encore loin d'être terminée.

3e *lot*. La terre s'est conservée jusqu'à la fin en bon état d'humidité. L'expérience est terminée le 16 juillet. L'analyse des extraits a donné :

	Az. nitreux mgr.	Az. nitrique mgr.	Az. ammon.
A	nul	44,3	nul
B	32,3	non dosable	nul
C	32,9	non dosable	nul
D.	nul	?	nul

1. Une absence de plusieurs semaines ne m'a pas permis de surveiller l'expérience de plus près.

Après l'analyse qualitative de l'extrait D, le liquide a été perdu par accident. Heureusement le résultat était d'une netteté qui rendait un dosage presque inutile : la diphénylamine donnait une réaction extrêmement intense, le réactif iodamylique et la métaphénylène-diamine n'en donnaient aucune trace, la liqueur Nessler également. Ce qui donnait la sûreté que la totalité de l'azote était de l'azote nitrique.

Les conclusions à tirer de ces expériences ne sont pas douteuses.

1° De la terre normale ne produit jamais que des nitrates, ce qu'on savait depuis longtemps. La formation de nitrite y est tout à fait passagère. Ce qui est pour nous le plus important à noter, c'est que, même en présence de quantités considérables d'ammoniaque, l'oxydation du nitrite n'est nullement paralysée, mais suit de très près sa formation. L'expérience *a'*, où la nitrification a été interrompue très tôt par manque d'humidité, est surtout instructive : nous y voyons, à un moment donné, beaucoup d'ammoniaque et d'acide nitrique, mais en même temps aucune trace d'acide nitreux. En cela l'ensemble du phénomène de nitrification dans le sol diffère essentiellement du même phénomène dans un liquide.

2° Aucun doute ne peut plus subsister sur ce que le ferment nitreux à l'état pur ne produit dans la terre, comme dans un liquide, que du nitrite, et que ce corps, une fois formé, n'est plus repris et oxydé par lui. Les expériences : série II, *b'*, *b* et B concordent parfaitement sur ce point. Les traces d'acide nitrique que montraient les extraits ne dépassaient qu'insensiblement celles que contenait la même terre avant l'expérience [1].

3° Le nitrite formé par le ferment nitreux dans la terre est tout aussi stable en présence de microbes banaux du sol, qu'il l'est dans une terre qu'il habite à l'état de pureté, si le ferment nitrique est absent. L'expérience B, 1re série, est surtout instructive sous ce rapport : au bout de trois mois, dans un sol repeuplé de différents microbes, comme on l'a directement constaté bientôt après le début de l'expérience, il n'y a pas eu production notable de nitrate. Les expériences *c*, *c'*, C, où la terre stérilisée a été

1. Dosées par la méthode du mercure sur 1/5 à 1/3 de l'extrait, elles ne donnaient lieu qu'à la formation dans le tube gradué d'une bulle de gaz, dont le volume n'atteignait pas 0,1cc.

réensemencée à dessein par les microbes du sol, sont bien aussi probantes, quoiqu'elles soient de plus courte durée.

4° Au contraire, si avec le ferment nitreux un ferment nitrique est introduit dans la terre stérilisée, — surtout si c'en est un aussi énergique que celui que nous avons isolé de la terre américaine, — le phénomène ne diffère en rien du phénomène naturel. La nitrification s'accomplit sans qu'il apparaisse passagèrement plus que des traces de nitrites (expériences *d'*, *d* et D). Et nous retrouvons ici au phénomène le même caractère que quand il a lieu dans une terre normale : le nitrite est oxydé au fur et à mesure de sa formation, quelle que soit la quantité d'ammoniaque encore restante. (Voir *d* et *d'*.)

Les expériences *d'*, *d* et *D* parent à une objection qu'on pourrait faire contre l'interprétation des expériences *b*, *b'*, *B* et *c*, *c'*, C : c'est que le sol chauffé à une si haute température pourrait bien être modifié chimiquement de manière à devenir un milieu peu favorable à la production de nitrate.

C'est justement pour répondre à cette objection que les expériences *c*, *c'*, C ont été instituées. Mais le ferment nitrique qu'on voulait introduire avec une trace de terre n'y a pas poussé, on ne saurait dire pourquoi. Il n'y a que dans une seule expérience *c*, que l'oxydation du nitrite a paru avoir commencé, dans les deux autres on ne l'a pas constatée. Ce ferment est-il moins répandu dans la terre que les ferments nitreux, de sorte qu'une trace de terre peut quelquefois ne pas contenir ses germes ? Ou le ferment nitrique de cette terre de Zurich est-il beaucoup plus faible que l'espèce provenant d'Amérique, ce qui aurait pour conséquence qu'introduit à *dose minimale*, avec le ferment nitreux et les autres microbes dans la terre, il n'a pas eu encore le temps de se développer et d'exercer son action ? On ne saurait répondre.

En tous cas les expériences *d*, *d'*, D, sont venues heureusement montrer qu'il ne faut pas s'arrêter à l'objection ci-dessus citée. La terre stérilisée reste un milieu tout aussi favorable à la production de nitrate que la terre normale, et si dans cette dernière le phénomène s'accomplit plus rapidement, c'est parce qu'elle est déjà remplie de ses microbes, au début même de l'expérience, tandis que dans le premier cas les traces de ces mêmes organismes qu'on ensemence doivent d'abord avoir le temps de se multiplier.

VII

Il ne nous reste qu'à jeter un coup d'œil rétrospectif sur tous les faits apportés par ce mémoire, à ce nouveau point de vue de l'action de deux organismes différents, et à comparer finalement nos conclusions avec celles des travaux les plus récemment parus.

En commençant par le fait de la suppression de la production de nitrates dans le milieu liquide, dont on s'est tant occupé, nous ne trouvons plus de difficultés à le comprendre. Il suffit de se rappeler d'autres exemples en ce genre si familiers au microbiologiste : de deux microbes, le plus énergique entrave et même arrête le développement de l'autre, autant que dure le sien. Que la vigueur de la végétation du ferment nitreux soit de beaucoup supérieure à celle du ferment nitrique, j'ai eu déjà l'occasion de le dire. Nul doute que la différence ne soit même très considérable ; je pense qu'elle est aussi grande entre ces deux êtres, qu'entre le ferment nitreux et la moyenne des microbes destructeurs de la matière organique, qui, comme on le sait, entravent facilement l'action de ce dernier quand ils peuvent se développer. Mais voici des données plus précises.

Quand ils sont placés exactement dans les mêmes conditions, sauf qu'il y a du sel ammoniacal dans un cas, du nitrite dans l'autre, l'action du ferment nitrique se poursuit beaucoup plus lentement que celle du ferment nitreux. Pour ce dernier, j'ai noté par exemple de nombreuses expériences, où l'oxydation de l'ammoniaque contenue dans un même vase a eu le cours suivant :

	Azote ammoniacal oxydé par jour.
Au bout du 5e jour.	3.0mgr.
— 10e —	9.0
— 14e —	10.6
— 16e —	13.0

En employant un vase plus grand, la quantité d'azote nitrifié montait toujours et atteignait au bout d'encore deux semaines 20mgr par jour et au delà.

Rien de pareil pour le ferment nitrique. Dans les mêmes vases (matras coniques à fond plat de 12 centimètres de diamètre), après une culture soutenue par des doses renouvelées

de nitrite, l'oxydation n'a atteint *au bout de six semaines*, que 10^{mgr} d'azote nitreux par jour. C'est le maximum que j'aie atteint jusqu'à présent avec un ferment nitrique d'une énergie exceptionnelle. Il se peut certainement que cette différence soit due en partie à mon expérience beaucoup plus longue de la culture du ferment nitreux, mais elle est beaucoup trop grande pour n'être attribuée qu'à cela. En considérant de plus que l'oxydation de l'azote ammoniacal exige beaucoup plus d'oxygène que la même quantité d'azote nitreux[1], on se fera une idée à quel point l'énergie de l'absorption de l'oxygène par le ferment nitreux dépasse celle du ferment nitrique.

On peut se figurer, d'après ce qui a été dit, ce qui se passe quand on ensemence une trace des deux ferments dans une solution ammoniacale. Le ferment nitreux prend tout de suite les devants, et quand l'autre commence à se développer en utilisant le nitrite formé, les cellules du premier sont déjà si nombreuses qu'elles s'emparent de tout l'oxygène dissous dans le liquide environnant, et étouffent la végétation du ferment nitrique.

N'oublions pas en outre que les deux organismes sont dépourvus de la faculté de se tenir à la surface du liquide, qu'ils sont tous deux au fond du vase dans un mélange intime, immergés sous une couche de liquide plus ou moins épaisse. L'oxydation de l'ammoniaque terminée, l'absorption de l'oxygène par le ferment nitreux s'arrête et ses cellules entrent à l'état de repos. Alors seulement la croissance du ferment nitrique peut commencer, mais elle se fait lentement et un certain laps de temps se passe encore jusqu'à ce qu'elle devienne notable. Voilà comment s'explique la marche du phénomène que nous avons signalé dans mes cultures mélangées.

Ensemençons maintenant une culture nouvelle par une trace de la plus récente, en pleine période nitreuse : il est clair que la semence pourra du coup ne plus contenir de germes de ferment nitrique, si ce microbe n'a pas eu encore le temps de pousser. Ou elle n'en contiendra que très peu, et l'oxydation du nitrite dans la culture-fille se fera finalement, mais très tard, pour se

1. Trois fois autant, si l'on admet que tout l'hydrogène passe à l'état d'eau, ce qui me paraît inévitable.

perdre à la suite d'un nouvel ensemencement fait dans les mêmes conditions.

Les cas ou cette fonction a été rapidement supprimée sont donc facilement explicables. Mais les cas où elle s'est maintenue plus longtemps — ces séries de cultures d'origine exotique, exigent encore quelques mots d'explication. Menées strictement de la même manière que les autres, elles ont persisté à produire des nitrates. Quelle en est la cause?

Il suffit d'admettre que les ferments nitreux de ces terres sont moins énergiques, ou que les ferments nitriques le sont plus que les organismes correspondants d'origine différente. Moins la différence de l'énergie de ces deux ferments est grande, moins l'action du ferment nitrique sera entravée, et mieux il pourra parvenir à se multiplier un peu pendant l'action du ferment nitreux. Il y aura ainsi plus de chances que la gouttelette d'ensemencement contienne ses germes.

En effet, la longue série d'expériences du tableau de la page 585 a montré que l'énergie relative de ces organismes varie beaucoup : qu'il y a des ferments nitreux moins puissants, des ferments nitriques plus puissants. Les terres d'Europe, je fus étonné de le constater, contiennent des ferments nitreux d'une énergie d'action plus grande que la majorité des terres exotiques. Deux surtout, celui de *Zurich* et de *Gennevilliers*, se sont signalés entre tous par la rapidité avec laquelle ils faisaient disparaître l'ammoniaque des cultures. C'est dans leur culture invariablement que la nitrification commençait le plus tôt; suivaient celles des séries *Java* et *Japon*, ainsi que les deux terres sud-américaines ; les quatre cultures d'origine africaine venaient toujours les dernières et considérablement en retard. Souvent, quand les premières traces des nitrites y apparaissaient, la transformation de l'ammoniaque était déjà terminée depuis plusieurs jours dans les deux premières. Cet ordre se maintenait si constant qu'il est impossible de l'attribuer au hasard, dont il faut, sans doute, bien tenir compte dans ces expériences [1].

Il y a ainsi raison de croire que le ferment nitreux de ces terres d'Afrique était moins vigoureux que les autres ferments

1. Je tâcherai de revenir ailleurs à ces faits d'un intérêt incontestable. Ici je ne puis que les signaler en passant.

de la même qualité; dans la terre *Quito*, par contre, nous avons trouvé un ferment nitrique d'une énergie au-dessus de la moyenne. Les variations que nous avons observées dans nos séries de cultures s'expliquent donc réellement dans le sens que nous avons indiqué.

Il suit, comme conséquence nécessaire de tout ce que je viens de dire, qu'en attendant chaque fois, avant d'ensemencer une génération nouvelle, que l'oxydation du nitrite s'accomplisse dans la plus récente, on pourra soutenir indéfiniment la production de nitrate dans ces cultures mélangées. C'est ce qui est prouvé par mes observations, mais surtout par celles de M. Warington[1] qui, en procédant ainsi, n'a pas vu le phénomène s'affaiblir au bout de deux ans de cultures successives en solution ammoniacale.

Passons maintenant au *milieu terre*. Quelle est la raison pour laquelle l'action du ferment nitrique n'y est presque jamais entravée, mais peut suivre de près celle du ferment nitreux? Il n'y a pas de difficultés à le comprendre: c'est la constitution physique du milieu qui intervient, *sa porosité*. Sa surface est énorme en comparaison avec un même volume de liquide ou d'un milieu de culture solide quelconque; et on conçoit aisément que les ferments nitreux ne parviennent jamais à étouffer la végétation des ferments nitriques dans une terre normale. Le nitrite, par conséquent, ne peut pas s'y accumuler. Mais on se figure, en même temps, que la formation de quantités considérables de nitrites peut très bien avoir lieu dans un sol submergé ou mal aéré, ou à la suite de doses exagérées et trop souvent répétées d'ammoniaque, ainsi que sous d'autres influences qui pourraient trop favoriser l'action du ferment nitreux ou directement gêner l'action du ferment nitrique.

Tout cela est conforme au peu d'observations dont on dispose. En étudiant sous ce point de vue la nitrification dans la terre, d'autres observations ne tarderont pas à venir confirmer ces idées.

Il me paraît inutile d'insister sur la facilité avec laquelle s'expliquent d'autres cas, où on a observé, dans quelque milieu

1. *On nitrification*, part IV, p. 492.

que ce soit, des circonstances favorisant ou entravant la production de nitrate [1].

La place me manque également pour discuter sous le jour de mes nouveaux résultats quelques questions d'une importance théorique et pratique très considérable. Il y aurait notamment beaucoup à dire sur les rapports entre une déperdition d'azote gazeux pendant la nitrification, et l'action favorisée ou entravée des deux ferments. On trouverait dans les expériences si importantes de M. Schlœsing [2] des faits très intéressants à analyser, mais on les interpréterait tout autrement que l'a fait ce savant.

Ayant terminé l'exposition de mes résultats, je passe à l'analyse de deux travaux récemment parus sur le même sujet, celui de M. Muntz [3] et celui de M. Warington [4], dont la publication a de près précédé la mienne [5].

M. Muntz a été conduit par des raisons théoriques à chercher la cause de la production régulière de nitrate dans le sol, contrairement à ce qui se passe dans un milieu liquide, dans l'intervention de phénomènes purement chimiques. Sans être d'accord avec les arguments tirés par M. Muntz de la thermochimie, nous les laissons de côté pour ne considérer que les faits, et ceux-ci ne laissent aucun doute que l'opinion de M. Muntz n'est pas acceptable. Je ne dirai que quelques mots de l'assertion de M. Muntz qu'une terre, dépourvue par un court chauffage des organismes nitrificateurs, mais contenant encore assez de germes banaux, est capable d'oxyder le nitrite, ce qui est en contradiction directe avec mes propres observations. La raison n'en est peut-être pas

1. Je rappellerai à cette occasion quelques expériences de nitrification décrites dans mon troisième mémoire (ce Recueil, t. IV, n° 12), où le taux de l'azote nitrique est monté à 5 et à 9 0/0 de l'azote total, tandis que dans d'autres faites en même temps il n'a pas été beaucoup supérieur à 1 0/0. La cause m'en est restée tout à fait obscure. Elle a été due évidemment à la présence du ferment nitrique. J'utilisais alors, les lecteurs des *Annales* se le rappellent, pour l'isolement du ferment nitreux, sa propriété de ne pas pousser sur la gélatine. Or, elle est propre aussi bien au ferment nitrique, qui a pu ainsi s'introduire dans les cultures, et exercer son action, dans les expériences où les doses d'ammoniaque se suivaient à des intervalles trop longs.

2. *C. R.*, t. CIX, p. 883.

3. *C. R.*, t. CXII, n° 20.

4. *Proceedings of the Chem. Soc.*, n° 98. *Journal of the Chem. Soc.*, p. 485.

5. J'ai résumé mes principaux résultats dans une note, présentée à l'Académie des sciences, le 13 juillet. Peu de jours après l'envoi de cette note, un résumé du travail de M. Warington (*Proceedings*, n° 98) m'est parvenu. Le travail détaillé de M. Warington (*Nitrification*, part IV) a suivi quelques semaines après.

difficile à comprendre : c'est que le chauffage a été trop court dans les expériences de M. Muntz. Après une demi-heure à 100° la température de la terre, si son volume a été grand, a pu ne pas atteindre dans les couches profondes un degré mortel pour les organismes les plus sensibles[1]. En prolongeant le chauffage, M. Muntz verra sa terre perdre complètement la propriété d'oxyder les nitrites, tout en contenant encore une multitude de microbes différents.

J'ajouterai encore une dernière remarque, qui touche à l'opinion de M. Muntz sur la décomposition du nitrite de chaux par l'acide carbonique dans le sol. Qu'une solution de nitrite de chaux peut être décomposée par un courant d'acide carbonique, on le savait déjà, mais on savait également que cette décomposition ne se fait pas en présence de carbonate de chaux en excès. Il n'y avait pas de carbonate de chaux dans l'expérience de M. Muntz, mais il y en a presque toujours dans la terre.

L'acide carbonique n'y a donc pas l'action sur le nitrite de chaux que lui attribue M. Muntz.

Elle ne l'a pas eu non plus dans quelques-unes de mes expériences de nitrification, faites en mai 1890, avec le carbonate de chaux comme base, pendant lesquelles le liquide de culture était chaque jour saturé par un courant puissant d'acide carbonique. En les dosant, on y a constaté du nitrite en abondance, mais rien que des traces de nitrate.

Personne ne niera certainement la possibilité d'une faible oxydation de nitrite dans la nature, sans l'intervention d'organismes. Mais je crois qu'on l'attribuera plutôt à l'action directe de l'oxygène ozonisé sur le nitrite, et je rappellerai les très intéressantes observations de M. Schönbein[2] sur ce sujet.

Quant au nouveau travail de M. Warington, cela me fait plaisir de constater que, lui et moi, nous sommes arrivés à des résultats semblables dans ce qu'ils ont d'essentiel.

M. Warington n'a expérimenté qu'avec le milieu liquide, et ses observations ne se rapportent qu'à ce milieu.

M. Warington confirme ses anciennes observations sur la

1. La pratique de la stérilisation a suffisamment démontré qu'une telle éventualité est très possible.

2. *Beitraege z. Kenntniss der Nitrification. Sitzungsber. d. bayrischen Akademie Sitzung, v.* 11 mai 1861.

diminution de la production des nitrates dans les cultures successives en milieu liquide, jusqu'à ce que la nitrification y assume un caractère purement nitreux. Il explique ce fait par ce que des ferments seuls persistent, qui transforment l'ammoniaque en acide nitreux, et il constate que ces ferments sont sans action sur ce corps une fois formé. M. Warington attribue l'oxydation du nitrite à un ferment spécial, dont il démontre la présence dans le sol par ensemencement dans une solution de nitrite. Il démontre ensuite que, par cultures dans cette même solution, le ferment nitreux est très facilement éliminé ; les organismes de ces cultures se montrent alors complètement dépourvus d'action sur l'ammoniaque : ensemencés dans une solution ammoniacale, ils n'y forment ni nitrites ni nitrates.

Il nous dit que ses tentatives d'isolement du ferment nitrique par culture sur les milieux solides ordinairement employés ont échoué, l'organisme n'y poussant pas. M. Warington n'en a pas essayé d'autres. Les substances organiques ne sont pas nécessaires pour l'action de cet organisme, qui peut agir indéfiniment dans une solution inorganique.

On voit que, sur tous ces points importants, les résultats de M. Warington et les miens sont complètement d'accord.

En me bornant au principal, je ne ferai qu'une seule remarque sur la manière dont M. Warington explique l'élimination du ferment nitrique des cultures mélangées en solution ammoniacale : ce serait le sel ammoniacal même que ce ferment ne pourrait supporter et qui entraverait sa croissance. Il est invraisemblable que des quantités si faibles de sels ammoniacaux que dans les expériences de M. Warington surtout, puissent exercer une action nuisible quelconque. La présence de ce sel, comme nous l'avons expliqué, n'a pour résultat que de rendre possible le développement du ferment nitreux, qui, lui, entrave la croissance du ferment nitrique.

Au reste, l'opinion de M. Warington est directement contredite par le fait que des doses considérables d'ammoniaque n'empêchent nullement l'action du ferment nitrique dans la terre[1].

Mais quand nous arrivons à la description que M. Warington donne des caractères morphologiques de ces organismes, — fer-

1. Voir les expériences de M. Schlœsing, C. R., t. CIX.

ments nitreux et nitriques, — l'accord ne subsiste plus. M. Warington, tout en croyant qu'il est hasardeux d'affirmer quelque chose de positif avant d'avoir isolé le microbe nitrique, trouve pourtant que la conclusion s'impose que ces deux organismes ne se distinguent pas l'un de l'autre par leur forme[1]. Il n'est pas impossible, quoique peu probable, qu'ils se ressemblent plus dans la terre d'Angleterre que dans celles que j'ai étudiées. Mais je ne puis accepter ni même comprendre la description que M. Warington donne de son ferment nitreux (p. 508), ni par conséquent, celle du ferment nitrique qui lui serait semblable par sa forme.

Les 5 photographies que M. Warington a jointes à son mémoire ne lèvent pas mes doutes : les deux premières représentant le ferment nitreux à cellules déformées, les trois dernières, entre autres celle qui doit représenter le ferment nitrique, n'évoquent en moi l'idée d'aucun organisme microbien.

Je reviendrai sur cette contradiction dans un mémoire sur la morphologie des ferments nitreux qui, j'espère, ne tardera pas à paraître.

1. *L. c.* p. 525.

EXPLICATION DES FIGURES

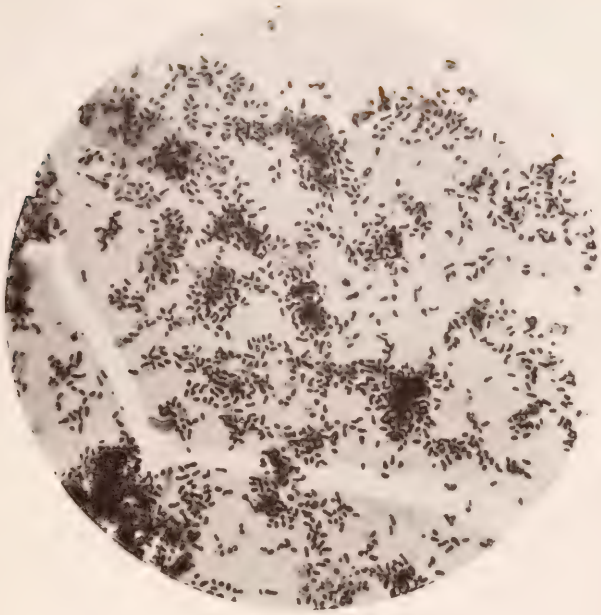
Les photographies ont été faites par M. Otto Muller à Zurich.

Le grossissement est de 1,000 diamètres, égal pour les deux. Il a été exactement contrôlé par la projection d'un micromètre.

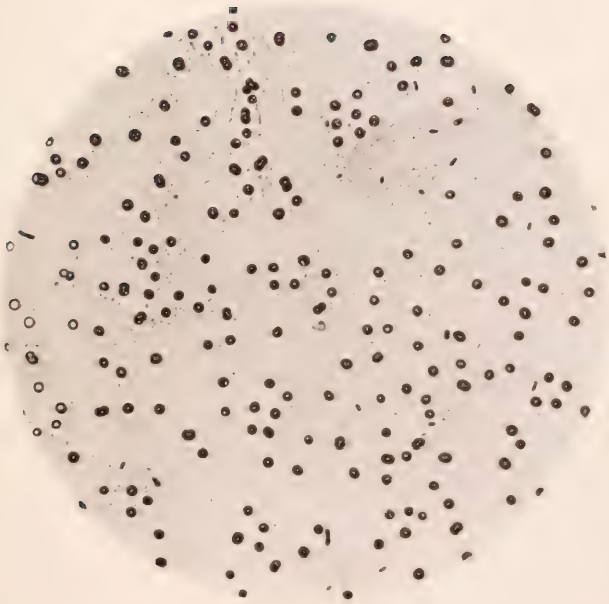
Fig. 1. — Ferment nitrique de la terre *Quito* provenant d'une culture en solution de nitrite.

Fig. 2. — Ferment nitreux de la même terre. Culture âgée sur silice gélatineuse.

1



2



Otto Müller, phot., Zurich. Photocollographie F. Thévoz & Cie, Genève.

REVUES ET ANALYSES

SUR QUELQUES ANTISEPTIQUES DE LA SÉRIE AROMATIQUE

REVUE CRITIQUE

HUEPPE. Sur les propriétés désinfectantes et antiseptiques de l'aseptol. *Berl. Klin. Wochens.*, 1886. — ESMARCH. Sur l'action de la créoline. *Centralbl. f. Bact.*, 1887. — GRIMM. Le tribromophénol comme antiseptique. *Deutsche med. Woch.*, 1887. — LAPLACE. L'acide sulfophénique brut comme désinfectant. *Id.*, 1888. — FRAENKEL. Les propriétés désinfectantes du crésol. *Archiv. f. Hyg.*, 1889. — ENGLER. Le lysol, nouvel antiseptique et désinfectant. *Pharm. centralb.*, t. XI, p. 449. — REMOUCHAMPS et SUGG. L'acide phénique, la créoline et le lysol. *Mouvement hygiénique*, Bruges, 1890. — SCHOTTELIUS. *Munch. med. Woch.*, 1890, n° 20. — V. GERLACH. Sur le lysol. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1891, p. 167. — H. HAMMER. Sur l'action désinfectante du crésol et la préparation de solutions aqueuses neutres de crésol. *Archiv. f. Hyg.*, 1891.

Nous avons déjà parlé dans ces *Annales* (V. t. III, p. 671), des tentatives faites pour trouver des antiseptiques dans les corps si variés de de la série aromatique. De ces tentatives sont sortis plusieurs corps nouveaux, aseptol, créoline, sozoiodol, lysol, etc., dont quelques-uns ont fait simultanément leur entrée dans la science et dans la pratique, et qui méritent tous d'être étudiés. Nous allons profiter, pour en faire une revue rapide, du travail intéressant que M. H. Hammer vient de publier.

Il rappelle avec justice, en commençant, le nom de Lemaire, qui a le premier observé les propriétés désinfectantes de l'acide phénique. Il aurait pu, avec autant de justice, citer celui du Dr Déclat, auquel on ne peut refuser le mérite d'avoir signalé les applications médicales qu'on pouvait faire de ce corps. On sait le parti brillant qu'en a tiré Lister dans sa méthode de pansement. Depuis que Koch lui a contesté sa valeur antiseptique, sa vogue est moins grande, et on a cherché avec méthode des agents plus puissants de désinfection.

L'acide phénique appartient, comme on sait, à la série aromatique, et on peut se le représenter comme contenant le noyau hexagonal qui constitue en ce moment le schéma caractéristique de cette série. Six atomes de carbone, attachés chacun aux six angles d'un hexagone régulier, et soudés chacun à un atome d'hydrogène, donnent la benzine, et si dans cette benzine on remplace à son tour un atome d'hydrogène par le groupement monoatomique OH, on a précisément l'acide phénique ou phénol.

En remplaçant de même un autre atome d'hydrogène par les groupements monoatomiques CH^3, C^2H^5, etc., on a les homologues supérieurs du phénol; en le remplaçant par des groupements SO^3H, on a des dérivés sulfonés; la substitution du groupement AzO^2 donnerait de même des dérivés nitrés, etc.

Les homologues supérieurs du phénol sont en général presque insolubles dans l'eau, mais les dérivés sont parfois solubles. Hueppe a précisément décrit, sous le nom d'aseptol, un dérivé sulfoné de l'acide phénique, moins caustique et plus antiseptique que cet acide. L'aseptol est en effet de l'acide orthophénylsulfoné..

On sait à quoi se rapporte ce préfixe *ortho*. Lorsque les deux groupements monoatomiques qui remplacent deux atomes d'hydrogène dans le schéma hexagonal de la benzine viennent se souder à deux angles adjacents de l'hexagone, on a le groupement *ortho*. Dans l'aseptol, les deux groupements OH et SO^3H, l'un qui transforme la benzine en phénol, l'autre qui transforme le phénol en acide sulfoné, remplacent dans la benzine deux atomes d'hydrogène placés consécutivement autour de l'hexagone. Quand ces deux atomes d'hydrogène sont séparés sur l'hexagone par un autre atome qui reste en place, on a le groupement *méta*. Quand ils sont séparés par deux atomes restant en place, et qu'ils se trouvent par conséquent eux-mêmes à deux angles opposés de l'hexagone, on a la modification *para*.

Or, Hueppe avait vu que l'acide orthophénylsulfoné était plus actif que l'acide paraphénylsulfoné, et même que si on chauffait le premier, ou si on le dissolvait dans l'eau chaude, ou bien encore si on laissait la masse s'échauffer pendant sa préparation, il devenait moins puissant, parce qu'il se transformait dans le second. Il y avait là un fait des plus intéressants, non seulement au point de vue pratique, mais encore au point de vue théorique, parce qu'il se résumait en ceci : introduction du groupement moléculaire dans la puissance comme antiseptique.

A ces acides sulfonés du phénol se rattache tout naturellement le sozoiodol, qui est à l'acide paraphénylsulfoné quelque chose d'analogue à ce qu'est l'iodoforme au gaz des marais. Au remplacement de trois de ses atomes de carbone par trois atomes d'iode, ce gaz des

marais ou méthane gagne des propriétés antiseptiques très nettes. De même l'acide paraphénylsulfoné, en échangeant contre deux atomes d'iode deux de ses atomes d'hydrogène, et en devenant de l'acide biiodoparaphénylsulfoné, devient un antiseptique plus puissant que son générateur. Sa découverte est due à Ostermayer.

Dans ce même ordre d'idées, nous rencontrons tout naturellement un autre antiseptique récemment entré sur la scène, l'aristol. En remplaçant un des atomes d'hydrogène du phénol par le groupement CH^3, on a le crésol, qui est du méthylphénol; en remplaçant deux atomes d'hydrogène par deux groupements CH^3, on a le xénol. En remplaçant dans le crésol un autre atome d'hydrogène par le groupement encore monoatomique C^3H^7, on a le thymol, qui est du propylmétacrésol. En remplaçant enfin dans ce thymol deux atomes d'hydrogène par deux atomes d'iode, on a le biiodothymol, qui est l'aristol du commerce.

Si je rappelle maintenant, pour terminer, les recherches bien connues de Laplace, sur l'augmentation d'activité que communique au phénol son mélange à l'acide sulfurique, mélange d'où résultent, partiellement au moins, des combinaisons sulfonées analogues à celles qu'avait étudiées Hueppe, nous voyons l'importance qu'a pris, tant en théorie qu'en pratique, la fabrication des dérivés sulfonés et iodés des corps de la série aromatique.

Dans ses expériences, Hueppe avait observé un autre fait important : c'est que les acides sulfonés, préparés avec l'acide phénique brut, étaient plus actifs que ceux qu'on tirait de l'acide phénique pur. Il en avait conclu qu'il y avait dans l'acide brut des homologues supérieurs du phénol, des crésols, des xénols, et d'autres produits de la distillation du goudron, dont la valeur antiseptique dépassait celle du phénol. Ces crésols ont surtout été étudiés par M. Fraenkel, dont nous avons déjà eu l'occasion de citer les travaux sur ce point. Comme ces corps sont insolubles dans l'eau, il les a dissous dans l'acide sulfurique concentré, et a vu ainsi s'accroître leurs propriétés antiseptiques. Il a reconnu, comme Hueppe l'avait fait pour le phénol, que ces propriétés étaient variables suivant qu'on laissait ou non le mélange s'échauffer pendant la réaction, ce dont il faut conclure sans doute, comme pour le phénol, qu'il se forme pendant l'opération des dérivés *ortho* ou *para* qui ne sont pas identiques comme désinfectants. Seulement ici, c'est la modification *méta* qui est la plus active ; puis vient le paracrésol et enfin l'orthocrésol.

Malheureusement, ces mélanges de crésols et d'acide sulfurique restent irritants et caustiques, et, de ce fait, leurs emplois sont très limités, de sorte qu'on a cherché d'autres moyens d'utiliser les propriétés antiseptiques des corps de la série aromatique. On a

essayé de les traiter par des alcalis ou d'en faire des émulsions savonneuses.

La créoline de Pearson, par exemple, n'est, d'après Henle, qu'une émulsion, dans un savon de résine, des produits les moins volatils de la distillation du goudron, crésols, xénols, etc., mélangés de quelques bases pyridiques [1]. Les phénols y manquent, tandis qu'ils sont au contraire prépondérants dans la créoline allemande d'Artmann, et dans le lysol de Schulke et Mayr, de Hambourg, comme cela résulte des analyses d'Engler.

Cette variabilité dans la composition enlève toute sécurité dans l'emploi de ces substances, et fait qu'on peut se méfier à bon droit de tous les nombres donnés pour mesure de leur puissance comme antiseptiques. Tout ce qu'on peut conclure des essais de Schottelius, de Remouchamps, de Sugg, de Gerlach, c'est que le lysol est plus puissant que la créoline, qui elle-même est au-dessus du phénol. Il est aussi moins toxique que les antiseptiques qui lui sont comparables. Gerlach a, par exemple, réussi à se stériliser les mains, sans savon, avec une solution à 1 0 0 de lysol, et à désinfecter les murailles avec une solution à 3 0/0. Dans les essais de Cramer et Wehmer, des éponges imbibées de pus et lavées à l'eau ont été stérilisées par un séjour d'une heure dans une solution de lysol à 2 0/0. D'après Remouchamps et Sugg, une solution à 5 0/0 suffit à désinfecter en *cinq secondes*, des mains, des instruments, des selles et d'autres produits souillés de microbes.

Toutes les créolines sont fortement alcalines, et il n'est pas douteux qu'une partie au moins des phénols ou crésols ne soit en combinaison avec les bases, donnant ces phénates étudiés à l'origine par M. Déclat. Il en est de même pour le lysol, qu'on prépare avec des savons très alcalins et de l'acide phénique brut. Il y a, à cette alcalinité, deux inconvénients : l'un, c'est que ces liquides rendent savonneux et font glisser les mains et les instruments; l'autre, c'est qu'ils s'oxydent à l'air et perdent ainsi de leur pouvoir antiseptique.

On supprimerait ces inconvénients en dissolvant tous ces corps aromatiques dans des liqueurs neutres. Les recherches faites dans cette direction par Kolbe, ont révélé ce fait curieux que le crésol peut se dissoudre dans des solutions concentrées de salicylate de soude. En mélangeant 10 grammes d'eau à 12 grammes de salicylate, on a une

1. Deux échantillons de créoline de Pearson analysés contenaient : l'un, 22,6 0/0 ; l'autre, 27,4 0/0 de phénols ou crésols. Le reste était fait, pour la majeure partie, d'hydrocarbures indifférents. Un échantillon de créoline de Artmann contenait seulement 15 0/0 de phénols et 85 0/0 d'hydrocarbures neutres ou indifférents ; un échantillon de lysol, dit pur, 47,4 0/0 de phénols et 36 0/0 d'hydrocarbures. On voit par là combien ces produits sont de composition variable.

bouillie dans laquelle il suffit d'ajouter 5 grammes de crésol pour obtenir un liquide limpide qui se laisse étendre d'eau sans que le crésol s'en sépare. Il se forme évidemment une combinaison du crésol avec l'acide salicylique, quelque chose d'analogue au corps qu'on a proposé comme antiseptique sous le nom de crésalol, et qui est au crésol ce que le salol est au phénol, une sorte de combinaison éthérée où le phénol joue le rôle d'alcool. Le point important pour nous, c'est que cette dissolution du crésol dans le salicylate de soude peut être rendue neutre, et, en outre, être étendue d'eau sans que le crésol s'en sépare.

Les phénols se comportent de même que les crésols, et pour les uns comme pour les autres, il est presque indifférent qu'ils appartiennent à la série *ortho*, *méta* ou *para*. Le salicylate de soude peut de même être remplacé par les salicylates de potasse, d'ammoniaque ou de chaux. Les benzoates sont un peu moins actifs que les salicylates. On sait que l'acide salicylique est le phénol de l'acide benzoïque, dans lequel un atome d'hydrogène a été remplacé par un groupement OH.

Enfin, on peut aussi remplacer les sels de ces acides organiques par des sels des phénols et des naphtols. Avec 32 grammes de crésol, 8 grammes de soude caustique et 32 grammes d'eau, on obtient, par exemple, une solution contenant 11 grammes de crésol libre en solution dans du crésylate de soude, et qu'on peut aussi étendre d'eau sans que le crésol s'en sépare.

Ce sont des solutions de cet ordre que M. Hammer a étudiées. Il les composait en faisant un mélange de 350 grammes de métacréosotinate de soude, de 500 grammes d'eau et de 250 grammes du crésol à étudier. Une de ces liqueurs, le n° I, contenait un mélange d'*ortho*, de *para* et de *métacrésol;* le n° II, un mélange de *méta* et de *paracrésol;* le n° III, du *métacrésol;* la solution IV de l'*orthocrésol*, et la solution V du *paracrésol*.

Toutes ces liqueurs se troublaient un peu quand on les étendait d'eau. Pour les étudier, on mélangeait 5cc d'une culture microbienne avec un volume égal de la solution antiseptique, employée à un degré de concentration double du degré voulu, et qui se trouvait ainsi amenée au degré de concentration convenable : on agitait, on laissait en contact, et au bout d'un temps variable, on prélevait, avec une anse de platine, une gouttelette du mélange qu'on ensemençait dans une gélatine nutritive. Comme contrôle, on ensemençait dans deux autres gélatines, d'un côté une gouttelette égale de la culture initiale non antiseptisée, et de l'autre une gouttelette de culture et une gouttelette de solution antiseptique au degré de l'expérience. On n'abandonnait l'examen de ces cultures d'essai qu'après huit jours, lorsqu'il était sûr que tout y était arrêté.

Voilà pour l'étude des bacilles sans spores. Pour les spores, on les récoltait sur des fils de soie qu'on baignait dans l'antiseptique, pendant un temps variable, et qu'on portait ensuite, après les avoir lavés, dans un milieu gélatinisé. Les expériences ont porté sur le bacille du pus vert, le M. *Prodigiosus* et le *Staphylococcus pyogenes aureus*. Pour les spores, on a pris des spores charbonneuses très résistantes.

Les résultats ont été que la solution à 1/1,000 n'a eu aucune influence sur les cultures. Avec les solutions à 3/1,000, les liq. I et III ont tué, au bout de 15 minutes, le bacille du pus vert. Vis-à-vis du staphylococcus, le liq. I s'est montrée plus actif que le liq. III, car il a stérilisé ce liquide en 30 minutes, tandis que le liq. III n'avait rien donné en une heure.

D'une manière générale, la solution I, qui contenait un mélange des 3 crésols, s'est montré plus active que les autres, tant sur les cultures que sur les spores. On sait que cette exaltation des antiseptiques l'un par l'autre est un fait assez général.

Fraenkel et Henle avaient trouvé que l'ordre de puissance était *méta*, *para* et *orthocrésol*. Ici, le paracrésol s'est révélé plus puissant que le métacrésol sur le M. *Prodigiosus*, qu'il tue en 10 minutes, tandis que le métacrésol ne stérilise le liquide qu'après 45 minutes de contact.

M. Hammer, s'en tenant alors au mélange des 3 crésols, a essayé d'augmenter encore leur puissance et d'obtenir des préparations plus économiques en remplaçant le métacréosotinate de soude par un mélange des trois créosotinates de soude, ou encore par les sels de soude formées par les dérivés sulfonés de la naphtaline.

Les différences constatées ne sont pas grandes, mais suffisent pour qu'on puisse recommander de préférence, comme très efficace, le mélange des 3 crésols dans le sel de soude des trois acides créosotiniques. C'est un liquide brun, sirupeux, très actif à la dose de 5/1000, lorsqu'on le fait agir sur des bacilles sans spores. Il l'est beaucoup moins sur les spores charbonneuses, qu'il met 5 jours à tuer lorsqu'il est à la dose de 5 0/0 ; mais pour les usages ordinaires, il a l'avantage de fournir les crésols à l'état de solution neutre, et de combler une lacune dans les moyens d'utiliser les propriétés antiseptiques si puissantes des corps de la série aromatique.

Il serait intéressant, après les corps de cette série déjà connus, d'énumérer ceux de la série de la naphtaline, qui résulte en quelque sorte de la soudure de deux atomes de benzine, avec élimination de 4 molécules d'hydrogène. Nous y rencontrerions les naphtols qui sont les phénols de la naphtaline, et d'autres antiseptiques moins connus. Mais l'étude en série de ces corps est encore peu avancée et il faut attendre.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personne traitée prise de rage pendant le traitement.

Sommier, Joseph, 6 ans, demeurant à Joudes (Saône-et-Loire); mordu le 12 août 1891 par un chien reconnu enragé, de son vivant, par M. Poly, médecin vétérinaire à Saint-Amour (Jura). La tête de l'animal ayant été adressée à l'Institut Pasteur, un cobaye inoculé le 16 août avec le bulbe a pris la rage le 15 septembre. — L'enfant Sommier porte sur la joue droite, à un centimètre au-dessous de l'œil, une morsure pénétrante, longue de 4 centimètres environ, qui a beaucoup saigné et n'a pas été cautérisée.

Il se présente aux inoculations le 16 août; le 29 août il prend la rougeole et est obligé d'interrompre le traitement. Le 31 août les premiers symptômes de la rage se déclarent. Sommier est conduit à l'hôpital des enfants. Il succombe à la rage le 2 septembre à 9 heures du matin. — Un autre enfant, mordu par le même chien, a subi le traitement complet et est actuellement en bonne santé.

Personnes traitées prises de rage après le traitement.

Juda, Isaac, 28 ans, médecin à Salonique (Turquie), mordu le 25 mai 1889, au petit doigt de la main droite; la blessure a saigné et a été cautérisée au thermocautère par le Dr Juda lui-même quelques instants après. Le chien a mordu trois autres personnes; on l'a tué et jeté à la mer.

M. Juda se présente aux inoculations le 3 juin; il subit le traitement jusqu'au 17 juin.

Le 8 juillet 1891, il ressent dans le doigt mordu des douleurs s'étendant le long du nerf radial; le 9, il y a hydrophobie marquée, et la mort survient le 11 juillet. L'incubation de la rage a été de deux ans et deux mois (Observation des docteurs Sciaky et Misrachi, de Salonique).

Pélofi, Baptiste, 21 ans, demeurant à Laurac (Aude), mordu le 7 février 1891 par un chien reconnu enragé, à l'autopsie, par M. Barbaste, médecin-vétérinaire à Fanjeaux. Pélofi porte sur le dos de la première phalange du pouce droit cinq morsures, dont quatre sont peu profondes; la cinquième, pénétrante, a beaucoup saigné. Il subit les inoculations du 14 février au 3 mars. Le 5 août, il ressent des douleurs dans le bras mordu. Le 7 août, les premiers symptômes de la rage se déclarent (hydrophobie, crachottements, etc.). Il meurt de la rage convulsive le 8 août. (Renseignements donnés par M. d'Hébrail, capitaine adjudant-major.)

Une autre personne, mordue par le même chien, a subi le traitement complet et est actuellement en bonne santé.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — AOUT 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	»	»	»	5	6	»	»	»
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	»		»	1		»	»	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	4	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	»	»	»
Morsures aux mains { simples	»	10	17	»	14	34	»	4	17
Morsures aux mains { multiples	»	7		»	20		»	13	
Cautérisations efficaces	1	»	»	3	»	»	4	»	»
— *inefficaces*	5	»	»	17	»	»	6	»	»
Pas de cautérisation	11	»	»	14	»	»	17	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	1	10	»	15	33	»	2	6
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	9		»	18		»	4	
Cautérisations efficaces	2	»	»	2	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	19	»	»	3	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	12	»	»	2	»	»
Habits déchirés	8	»	»	24	»	»	6	»	»
Morsures à nu	2	»	»	9	»	»	»	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	3	3		1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	3	»	»	1	»	»
Habits déchirés	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Morsures à nu	1	»	»	3	»	»	1	»	»
Totaux. { Français et Algériens		22	28		68	76		20	24
Totaux. { Etrangers		6			8			4	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					128				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 107 fois; chats, 12 fois; vaches, 6 fois; cheval, 1 fois; âne, 1 fois. Dans un cas, la morsure a été faite par un enfant atteint de rage.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

5me ANNÉE. OCTOBRE 1891. N° 10.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

EXPÉRIENCES

SUR

L'ATTÉNUATION DU VIRUS FIXE RABIQUE

PAR MM. V. BABES et TH. CERCHEZ.

(Travail de l'Institut de pathologie et de bactériologie de Bucarest.)

C'est une des nouvelles directions de notre science que de chercher l'influence des liquides et des éléments figurés de l'organisme sur les virus. Après avoir établi [1] le pouvoir vaccinatoire du sang des animaux très vaccinés contre la rage, il était naturel d'étudier l'action qu'exercent sur le virus rabique les cellules et les liquides des animaux naturellement réfractaires à la rage.

Comme tel, nous avons choisi la grenouille qui, même exposée à une température au-dessus de 30°, ne contracte par la rage, tandis qu'elle peut contracter le tétanos si, après l'inoculation avec le bacille tétanique, on expose cet animal à la température des mammifères [2].

1. BABES et LEPP, ces *Annales*, juillet 1889.
2. BABES et PUSCARIN, *Centralbl. f. Bacteriol.*, 1890.

I

ÉTUDE DE L'ATTÉNUATION DU VIRUS RABIQUE DANS LE SAC DORSAL DE LA GRENOUILLE.

La première série de nos expériences a eu pour objet d'étudier le *degré d'atténuation que subit le virus rabique dans le sac lymphatique de la grenouille.*

Le 2 décembre 1890, nous avons commencé à introduire chaque jour, dans le sac lymphatique de une ou deux grenouilles, de la moelle et du bulbe d'un lapin mort de la rage à virus fixe, de façon à pouvoir disposer, à un moment donné, de virus fixe ayant séjourné des temps variables au contact des liquides de ce sac. On refermait ensuite l'ouverture avec plusieurs serrefines.

Pour chaque expérience, on faisait sortir du sac un peu de moelle dont on faisait une émulsion qu'on injectait sous les méninges par trépanation, ou plus simplement sous la peau de lapins et de chiens.

Voici le résumé d'une de nos expériences, faite par trépanation. La seconde colonne du tableau donne la durée du séjour, dans le sac lymphatique, de la moelle et du bulbe injectés ; la troisième la durée de survie du lapin trépané et inoculé ; la quatrième les observations de la nécropsie.

Dates.	Lapins.	Durée.	Survie.	Observations.
4 déc.	A	2 jours	11 jours	Convulsions, paralysie du train postérieur ; animaux certainement rabiques.
6 »	B	4 »	11 »	
7 »	C	5 »	9 »	
» »	D	5 »	9 »	
8 »	E	6 »	8 »	
» »	F	6 »	8 »	
9 »	G	7 »	3 »	Maladie inconnue, non rabique.
» »	H	7 »	8 »	Animal rabique.
10 »	I	8 »	5 »	Maladie non rabique.
» »	J	8 »	7 »	Animal rabique.
19 »	M	13 »	30 »	Id.
» »	N	17 »	36 »	Id.

Le tableau suivant, établi sur le même plan que le premier, se rapporte aux moelles ayant passé de 11 à 20 jours dans le sac dorsal de la grenouille.

Dates.	Lapins.	Durée.	Survie.	Observations.
31 déc.	A′	11 jours	8 jours	Animal rabique.
1er janv.	B′	12 »	3 »	Maladie non rabique.
1er »	C′	14 »	9 »	Animal rabique.
16 »	D′	14 »	9 »	Id.
2 »	E′	15 »	13 »	Id.
18 »	F′	15 »	8 »	Id.
» »	G′	16 »	9 »	Id.
» »	H′	16 »	9 »	Id.
» »	I′	18 »	9 »	Id.
» »	J′	19 »	3 »	Péritonite, non rabique.
» »	K′	20 »	24 »	Animal rabique.

Si on élimine de ces tableaux les animaux morts de maladies intercurrentes, on voit que le virus s'atténue de façon très nette, par séjour dans le sac lymphatique de la grenouille, mais il y conserve davantage sa virulence qu'à l'air libre, car ce n'est guère qu'après 15 jours de séjour qu'il commence à s'atténuer, et encore irrégulièrement.

Les cellules migratrices de la grenouille apparaissent pourtant dans la substance nerveuse, peu de jours après l'introduction de la moelle rabique dans le sac dorsal. En examinant en effet cette moelle après 5 jours de séjour dans ce sac, on y voit à l'œil nu des flocons rouge foncé flottant dans une masse de lymphe sanguinolente. Au microscope on voit des globules rouges intacts, et un grand nombre de leucocytes à la périphérie des flocons renfermant des fragments de nerfs et des cellules nerveuses. On y trouve aussi un grand nombre de cellules plus grandes que les globules rouges, mais rondes, verdâtres, avec de fines ramifications protoplasmiques. Çà et là, une grande cellule polynucléaire. Très peu de myéline; quelques granulations claires, irrégulières, qui ne sont pas des microbes. Il y a aussi quelques cellules mononucléaires ayant dans leur protoplasma des granulations de 0,5 μ, colorables en violacé par le violet de méthyle B.

Voici maintenant des expériences dans lesquelles le virus sortant du sac de la grenouille a été injecté non par trépanation, mais sous la peau :

Exp. I. Un lapin et un chien reçoivent sous la peau, du 10 au 17 décembre, un centimètre cube d'une émulsion de moelle ayant séjourné des temps variés dans le sac dorsal de la grenouille.

10 décembre.	Moelle	ayant	séjourné	8	jours.
11	»	»	»	7	»
12	»	»	»	6	»
13	»	»	»	5	»
14	»	»	»	4	»
15	»	»	»	3	»
16	»	»	»	2	»
17	»	»	»	1	»

Le lapin meurt rabique le 18 décembre. Le même jour, le chien reçoit le virus rabique frais. Le 5 janvier, nouvelle injection du virus fixe. Le 25 janvier, trépanation et inoculation du virus des rues. L'animal continue à se bien porter.

Exp. II. Un lapin et un chien reçoivent, comme les précédents, du 11 au 20 décembre, la série des moelles ayant séjourné de 8 à 10 jours dans le sac dorsal de la grenouille. Le lapin meurt le 22 décembre, c'est-à-dire 11 jours après la première inoculation. Le chien résiste, reçoit, le 5 janvier, sous la peau, de la moelle rabique fraîche; le 25 janvier, sous la dure-mère, du virus des rues. Il reste bien portant.

Exp. III. Un lapin et un chien reçoivent, comme les précédents, du 12 au 22 décembre, les moelles ayant séjourné de 10 à 6 jours dans la grenouille. Le lapin meurt rabique le 26, 14 jours après la première inoculation. Le chien résiste, le 25 janvier, à une injection de virus fixe, le 9 février à une trépanation avec du virus des rues. Il est encore bien portant.

Nous passons, pour abréger, sur trois autres expériences moins complètes, ou moins nettes, dont les résultats ont été troublés par des maladies intercurrentes sur le lapin ou le chien. Celles qui précèdent suffisent à montrer que la moelle conservée dans le sac dorsal de la grenouille peut devenir, pour le chien, un vaccin assez puissant. Sur huit chiens inoculés sous la peau, 2 sont morts de maladies intercurrentes, et 6 se portent bien, quoiqu'ils aient reçu : 2 des moelles ayant séjourné de 23 à 3 jours dans la grenouille, et les 4 autres respectivement des moelles de 10, 9, 8 et 7 jours de séjour jusqu'à la moelle fraîche. Tous ont résisté ensuite à une trépanation par le virus de la rage des rues.

Dans les expériences qui précèdent, les lapins succombaient quand on les soumettait aux inoculations qui conféraient l'immunité aux chiens. Mais cela pouvait tenir à ce qu'on commençait par des moelles trop jeunes, n'ayant pas séjourné assez longtemps dans le sac dorsal. Pour le savoir, nous avons inoculé, à partir du 1er janvier, à 2 lapins, la série des moelles ayant de

23 à 15 jours de séjour dans le sac. L'un est mort le 15 janvier d'une maladie intercurrente; l'autre succombe à la rage le 18 janvier. Un autre lapin, ayant reçu, à partir du 1er janvier, la série des moelles de 23 à 3 jours, meurt le 1er février, aussi de la rage. Deux autres lapins, ayant reçu, à partir du 16 janvier, les moelles de 23 à 12 jours, succombent à la rage, l'un 34 jours, l'autre 45 jours après la première inoculation.

On n'a donc pu vacciner les lapins en leur injectant sous la peau des moelles ayant séjourné des temps très variés dans le sac dorsal de la grenouille; mais, comme dans les expériences de trépanation, ces moelles se sont révélées d'autant moins virulentes qu'elles avaient un plus long temps de séjour dans ce sac.

II

ACTION DE LA LYMPHE DE LA GRENOUILLE SAINE SUR LE VIRUS RABIQUE EN DEHORS DE L'ORGANISME.

Les expériences précédentes donnaient quelque intérêt à l'étude des effets de la lymphe intacte de la grenouille sur le virus rabique; il n'était pas sans utilité d'examiner aussi l'action de cette lymphe en dehors de l'organisme. Pour avoir de la lymphe, on introduisait dans le sac dorsal des petites éponges stérilisées, qui se remplissaient de lymphe, et dont on pouvait tirer quelques grammes de liquide. On mêlait ce liquide à une quantité égale d'une émulsion fine de virus fixe, filtrée sur du papier Joseph. Après un certain temps de contact, ce mélange était introduit par trépanation sous les méninges de lapins. Tandis que l'émulsion de la moelle rabique est encore bien virulente 6 heures après sa préparation, cette même émulsion, mêlée avec la lymphe de la grenouille, perd assez vite sa virulence.

Ainsi 4 lapins inoculés avec une émulsion du virus fixe qui a été en contact avec la lymphe de la grenouille pendant 6 heures n'ont pas gagné la rage, tandis que 2 lapins qui ont reçu ce mélange une heure seulement après sa préparation ont succombé à la rage.

L'action beaucoup plus énergique de la lymphe de la grenouille dans cette expérience s'explique probablement par le con-

tact intime de l'émulsion de moelle avec la lymphe, tandis que dans l'expérience précédente les parties centrales de la moelle introduite dans le sac lymphatique de la grenouille ont été longtemps à l'abri de la lymphe.

III

ACTION SUR LE VIRUS RABIQUE DU SANG DE CHIEN RÉFRACTAIRE A LA RAGE.

Ayant à notre disposition un certain nombre de chiens vaccinés et revaccinés contre la rage, nous en avons profité pour chercher quelle était l'action de leur sang sur le virus rabique fixe. Il y a eu, à ce sujet, deux séries d'expériences. Dans les premières, faites par l'un de nous avec M. Lepp[1], et répétées par MM. Eremia et Talasescu, assistants à notre Institut, on a employé trois modes d'inoculation : l'un (*a*) en injectant aux chiens et aux lapins d'expérience, d'abord le sang de chien réfractaire, puis le virus fixe ou le virus des rues ; l'autre (*b*) en faisant les deux injections simultanément ; le dernier (*c*) en commençant par le virus rabique, et en continuant par le sang. Dans une deuxième série d'expériences, on a inoculé à des lapins un mélange, fait depuis 6 heures et laissé au frais, de sang et d'émulsion filtrée de virus fixe.

Première série. (*a*) 1. — Un lapin reçoit sous la peau, le 4 décembre 1890, 1cc de sang frais retiré de la jugulaire d'un chien réfractaire. Le lendemain, nouvelle injection toute pareille, et, aussitôt après, trépanation et inoculation de virus fixe. Le 8 décembre, troisième injection de 1cc de sang. Le lapin meurt rabique le 11 décembre. Donc, aucune action bien sensible.

2. — Deux chiens et deux lapins reçoivent sous la peau, le 10 janvier 1891, chacun 1cc de sang tiré de la jugulaire d'un chien réfractaire. Le jour suivant, nouvelle inoculation de 2cc ; et immédiatement après un des lapins est trépané et reçoit sous les méninges du virus fixe. Le 12 janvier, inoculation à tous les animaux de 3cc de sang, et le deuxième lapin est aussitôt traité comme le premier. Le 3 janvier, inoculation à tous les animaux de 4cc de sang, et immédiatement après on inocule les chiens sous les méninges avec du virus fixe. Le 14 janvier, inoculation générale de 5cc de sang. Les lapins meurent tous deux rabiques le 19 janvier. L'un des chiens a succombé à la rage ; l'autre a résisté.

1. Babes et Lepp, ces *Annales*, juillet 1889.

L'injection de sang semble donc avoir pour le chien, sinon pour le lapin, des propriétés vaccinantes.

(*b*). Un chien reçoit, le 4 décembre, dans des plaies faites sur la conjonctive et à l'oreille, un mélange de 1cc de sang de chien réfractaire avec une émulsion de virus fixe. Le 5 décembre, nouvelle inoculation de 4cc du mélange autour des plaies. Le chien succombe à la rage le 27 décembre, c'est-à-dire après 23 jours, ce qui indique un retard dans la marche de la maladie.

(*c*) 1. — Le 3 janvier 1891, 4 chiens reçoivent, sous les méninges, du virus de la rage des rues. L'un d'eux est gardé comme témoin. Les trois autres reçoivent chacun sous la peau, aussitôt après la trépanation, 4cc du sang d'un chien réfractaire, et, du 4 au 8 janvier, chaque jour une injection de la même quantité. Le chien témoin meurt le 27 janvier. Des trois autres, l'un a résisté, les autres succombent à la rage après 52 et 63 jours.

2. — Un lapin reçoit sous les méninges, le 7 janvier, du virus des rues, et immédiatement après, sous la peau, 1cc,5 de sang de chien réfractaire. Même injection de sang le lendemain et le surlendemain. Il meurt rabique après 6 jours, le 13 janvier.

3. — Un autre lapin subit successivement le 10 janvier l'inoculation virulente sous la dure-mère et l'injection de 2cc de sang de chien réfractaire. Le 10, inoculation de 3cc de sang; le 12, de 4cc; le 13, de 5cc. Le lapin meurt après 7 jours.

4. — On inocule par trépanation du virus fixe, le 8 janvier, à un lapin, et le 9, à un autre lapin. Ces animaux reçoivent sous la peau, le 10 janvier, 4cc de sang; le 11, 3cc ; le 12, 4cc; le 13, 5cc; le 14, 6cc. Ils meurent tous deux rabiques, le 8e jour après l'injection.

Ainsi, le sang de chien réfractaire, inoculé aux lapins avant ou après injection avec le virus de la rage des rues, n'atténue pas sensiblement sa virulence.

Chez les chiens, au contraire, l'atténuation se fait et le sang prend des propriétés vaccinantes, car sur 4 chiens inoculés par trépanation avec le virus rabique, et traités ensuite par le sang de chien réfractaire, deux ont succombé avec un retard notable et deux ont résisté.

Voyons maintenant ce que donne l'inoculation du mélange fait à l'avance de sang et de virus.

Deuxième série. — Si on inocule aux lapins ou aux chiens un mélange de sang de chien réfractaire avec une émulsion de virus fixe, immédiatement ou bien une heure après sa préparation, ces animaux succombent toujours à la rage. Si, au contraire, on laisse le sang plus longtemps en contact avec le virus, celui-ci

perd peu à peu son activité. Ainsi deux lapins sont trépanés et inoculés avec un mélange, fait depuis 6 heures, d'émulsion de virus fixe filtré et de sang de chien réfractaire. L'un résiste, l'autre meurt après 36 jours d'une maladie qui n'était pas la rage, car l'inoculation de son bulbe est restée sans résultat.

Le virus rabique semble donc détruit par son mélange avec le sang de chien réfractaire.

Toutes ces recherches confirment donc de nouveau notre affirmation que *les liquides ou les cellules des animaux immunisés ou naturellement réfractaires contre la rage sont en état de transmettre l'immunité à d'autres animaux.* Elles nous donnent en outre un moyen de préparer des vaccins antirabiques tout à fait inoffensifs.

Nous avons essayé une première application de ce moyen au traitement de 26 malades, mordus terriblement à la tête par un loup enragé. On sait quel chiffre élevé donnent les statistiques de M. Pasteur pour les morsures de ce genre. Partant de là, nous avons ajouté pour ces mordus, au traitement de M. Pasteur, le suivant : 12 d'entre eux, et notamment les plus gravement mordus, ont reçu, en 4 ou 6 fois, une injection de 10 grammes de sang d'homme ou de chien immunisés [1]. Le résultat a été très encourageant, car pendant le traitement je n'ai eu qu'un cas de mort parmi les personnes que j'ai vaccinées avec ce sang. La seule personne, gravement mordue par ce même animal, qui ne soit pas venue à Bucarest pour se faire traiter, est morte de la rage.

Ce résultat nous encourage à poursuivre nos tentatives dans la même direction.

1. Deux garçons de laboratoire, Joa Jonescu et Georges Gal, attachés au service anti-rabique, et qui se sont fait vacciner plusieurs fois d'après notre méthode intensive, ont consenti à donner de leur sang, que nous avons retiré par des ventouses.

NOTES SUR LA RAGE EN INDO-CHINE

ET SUR LES

VACCINATIONS ANTIRABIQUES PRATIQUÉES A SAÏGON

DU 15 AVRIL AU 1er AOUT 1891

PAR M. LE Dr ALBERT CALMETTE,

Médecin de 1re classe du corps de santé militaire des colonies.

A l'exception d'un cas de rage humaine signalé en 1870 par Lalluyeaux d'Ormay, cette maladie est restée à peu près méconnue ou ignorée des Européens dans nos possessions de l'Indo-Chine jusqu'en 1880. Depuis cette époque, en revanche, on la signale un peu partout dans l'intérieur du pays. A Saïgon même, deux Européens sont morts d'hydrophobie confirmée à l'hôpital colonial, en 1887 et 1888. En Annam et au Tonkin, nos compatriotes ont déjà compté, depuis l'occupation, une dizaine de victimes de cette maladie : entre autres, il y a deux ans, le fils d'un vice-résident, M. Wulfhing, et l'année dernière, au mois de juillet, un commis de résidence, M. Lamothe-Vayssière. (V. les documents à la fin de ce travail.)

L'impossibilité presque absolue, pour les personnes mordues, de se rendre en temps utile à l'Institut Pasteur de Paris pour y subir le traitement antirabique, a poussé le Conseil supérieur de santé des colonies à tenter d'organiser, dans la capitale française de l'Extrême-Orient, un service de vaccination après morsure. En même temps que je recevais la mission d'y créer un Institut de vaccine animale et un Laboratoire de recherches micrographiques et expérimentales pour l'étude des maladies des pays chauds, j'étais chargé de m'enquérir sur place des conditions dans lesquelles le fonctionnement d'un tel service pourrait être assuré.

Aussitôt débarqué dans la colonie, j'ai dû commencer par faire une enquête sur la fréquence plus ou moins grande de la rage dans la région. Un nombre assez considérable d'observations cliniques très complètes et de renseignements pleins d'intérêt m'ont été communiqués par les médecins de la Basse-Cochinchine, de l'Annam et du Tonkin. D'autres ont été recueillis par moi-même de la bouche de personnes étrangères à la médecine, ou retrouvés à Saïgon dans les archives médicales de la colonie. J'ai pu réunir beaucoup de faits très concluants, desquels il ressort que les victimes de l'hydrophobie dans l'Indo-Chine française seule, proportionnellement à la population, ne sont guère plus rares qu'en France.

C'était à supposer d'ailleurs, puisque cette affection est très répandue dans les contrées voisines, à Java, à Singapore et dans toute la presqu'île de Malacca [1]. Il eût été bien surprenant que, seuls, les chiens de notre colonie fussent doués d'une immunité particulière, alors que leur race est la même que celle de ces pays.

Cependant beaucoup d'anciens administrateurs, très au courant de la langue et des mœurs annamites, affirment le plus sincèrement du monde n'avoir jamais eu connaissance d'un cas de rage. Ils ont souvent entendu parler des *chiens fous* (cho giai), dont les habitants redoutent à ce point les morsures que, s'il leur arrive d'être mordus, ils vont aussitôt commander leur cercueil; mais ils ne croient pas à l'identité de cette maladie des chiens et de la rage.

Je dois reconnaître, en revanche, que presque toutes les personnes vraiment compétentes, parmi lesquelles le vétérinaire

1. A Singapore, depuis deux ans, les victimes de la rage ont été si nombreuses que des mesures coercitives d'une extrême rigueur ont dû être prises par le gouvernement de cette île. Pendant les mois de février, mars et avril de cette année, près de six mille chiens errants ou sans maître ont été détruits; ceux qui figurent sur les registres de la municipalité ne doivent circuler dans les rues, depuis le 1er juin, que muselés et tenus en laisse. Chaque propriétaire, en payant la taxe annuelle pour son chien, reçoit gratuitement une muselière d'un modèle uniforme, et l'importation de chiens étrangers restera formellement interdite pendant une année.

Plusieurs personnes mordues ont pu venir se faire traiter à l'Institut Pasteur, à Paris, mais un voyage si coûteux n'est pas à la portée de toutes les bourses, outre que sa durée, de 26 jours au moins, rend très incertains les effets du traitement.

de l'artillerie, M. Duchêne, ancien élève de l'École d'Alfort, m'ont exprimé une opinion diamétralement opposée.

Néanmoins, avant de pratiquer les vaccinations, il était nécessaire de procéder scientifiquement et de s'assurer, par voie d'expériences, que la maladie des *chiens-fous* était bien la *rage*.

L'occasion ne s'en fit pas longtemps attendre.

Le 3 avril, M. Duchêne me fit amener un chien métis qui paraissait furieux, et avait mordu trois autres chiens quelques instants auparavant. Je le gardai en observation en priant M. Duchêne de venir le voir régulièrement avec moi. Les symptômes de rage furieuse qu'il présentait ce jour-là ne permettaient déjà aucune hésitation dans le diagnostic. La paralysie du train postérieur apparut dans la matinée du 4, et le 5, dans la soirée, l'animal succomba.

Son cadavre fut gardé dans la glace pendant la nuit suivante, et, le 6 au matin, j'inoculai par trépanation à deux lapins, et devant témoins, parce que je voulais donner de la publicité à cette expérience, un fragment de son bulbe broyé dans du bouillon de veau stérilisé.

Les deux lapins furent pris de rage, l'un le 13e, l'autre le 17e jour. Le bulbe du premier, inoculé à deux lapins neufs, dans la chambre antérieure de l'œil, développa la rage en 14 et 19 jours.

Un petit chien ratier, de race européenne, appartenant à un magistrat, et qui avait été mordu assez grièvement à la tête, par le chien précédent, le 3 avril, me fut amené le 7. Je le gardai en observation, et il mourut de la rage la mieux confirmée le 22 mai.

Un autre petit chien mouton, mordu également le même jour, et chez lequel la rage éclata le 11 mai, m'avait été conduit la veille de sa mort. Son maître, très attaché à lui, mais très persuadé aussi qu'il n'existait point de rage en Cochinchine, n'avait pas voulu s'en séparer jusqu'alors, bien qu'il eût été averti du danger par son beau-frère, propriétaire du premier animal dont j'avais fait l'autopsie.

Ces trois cas de rage canine, bientôt suivis de deux autres, survenus coup sur coup peu de temps après mon arrivée dans la colonie, laissent à penser qu'il doit s'en présenter assez fréquemment dans ce pays où les chiens errants sont très nom-

breux. Je ne puis donc m'expliquer que la vraie nature de cette affection ait échappé si longtemps à l'observation des Européens.

Poursuivant le travail que j'avais entrepris, je me décidai, en présence de ces premiers résultats expérimentaux, à tenir en réserve, dans mon laboratoire, des séries de moelles rabiques atténuées, et à organiser définitivement un service régulier de vaccination contre la rage après morsure, accessible à tous les Européens ou indigènes de l'Extrême-Orient.

Quelques-uns de nos compatriotes, du moins, y pourraient gagner la vie sauve, et peut-être les Annamites qui, dans ce coin d'Extrême-Orient, ont l'esprit très accessible à nos idées progressistes, ne tarderaient-ils pas à venir eux-mêmes demander nos soins, d'autant plus volontiers qu'ils seront toujours gratuits.

Les conditions dans lesquelles ce service devait être assuré étaient très différentes de celles qui se présentent dans les Instituts antirabiques d'Europe, et mon installation matérielle rudimentaire allait m'obliger à bien des expédients dont j'avais, avant tout, à faire l'épreuve pour ne pas m'exposer à des mécomptes cruels.

Ainsi je n'avais point à ma disposition de chambre à température constante pour les moelles. Il ne me fallait pas songer non plus à entretenir chaque jour une ou deux séries continues de lapins inoculés. C'eût été une dépense trop forte pour mon maigre budget, et de plus, je m'attendais à n'avoir à traiter qu'un très petit nombre de personnes, surtout au début. Il fallait donc chercher un moyen plus économique d'avoir toujours une série de moelles prêtes à servir.

J'ai pensé, pour cela, à utiliser la propriété que possède la glycérine pure à 30° B^{é}, de conserver assez longtemps aux centres rabiques leur virulence intacte[1], à la condition de rester au voisinage de 0°. Cette méthode m'avait réussi pour les quatre cerveaux de lapins apportés de France à Saïgon, et qui, conservés dans la glacière du paquebot pendant la traversée, avaient gardé, après 36 jours de voyage, leur virulence à peu près intacte, puisque inoculés par trépanation, à l'arrivée,

1. Roux, Note sur un moyen de conserver les moelles rabiques avec leur virulence; ces *Annales*, 1887, p. 87.

ils avaient tué un lapin en 14 jours. Dès le second passage, l'incubation redevint normale; au troisième, il y eut un nouveau retard de deux jours chez un des lapins inoculés; mais, depuis, tous les lapins trépanés ont été régulièrement pris de rage le 7e ou 8e jour et sont morts le 11e ou le 12e.

J'en suis à mon quinzième passage de la moelle de 273e passage rapportée de France. Les moelles, conservées comme à l'ordinaire en présence de la potasse, dans une chambre dont la température reste voisine de 30°, s'y dessèchent un peu plus vite qu'en France.

Pour savoir si leur immersion dans la glycérine les immobiliserait au degré atteint d'atténuation, j'ai pris un mélange de moelles de 14, 13 et 12 jours, un autre de moelles de 6 à 7 jours, une moelle de 3 jours, et je les ai laissées séjourner dans la glycérine pendant un nombre de jours égal à leur âge au moment de l'immersion. Au bout de ce temps on en a fait une émulsion comme à l'ordinaire. Les moelles de 14, 13, 12 jours inoculées à deux lapins, à l'un par trépanation, à l'autre dans la chambre antérieure de l'œil, les ont laissés vivants.

Le lapin inoculé dans la chambre antérieure avec la moelle de 6-7 jours, a succombé seulement après 26 jours. La moelle de 3 jours a tué un lapin trépané au bout de 12 jours. Enfin un chien est devenu enragé en 11 jours, après inoculation dans la chambre antérieure, d'une moelle de 1 jour, conservée dans la glycérine pendant trois semaines.

En présence de ces résultats, je me suis cru autorisé à compter sur ce procédé de conservation des moelles, au cas où des individus mordus se présenteraient, pour me tenir prêt à pratiquer des vaccinations sans avoir besoin d'entretenir journellement des passages de virus de lapin à lapin. Toutefois, je me fis une règle de rejeter les moelles restées depuis plus de 14 jours dans la glycérine. Je renouvelle actuellement, à chaque passage du virus de la même série de lapin à lapin, au fur et à mesure, celles de mes moelles d'atténuation échelonnée qui sont les plus anciennes. Deux lapins tous les douze jours environ suffisent à m'approvisionner, car une seule moelle fournit facilement six ou sept tronçons de 1 cent. 1/2 à peu près; chaque jour, un de ces tronçons est mis à la glacière, dans un flacon plein de glycérine stérilisée.

Je n'ai rien changé, par ailleurs, à la méthode pastorienne du traitement après morsure. Je pratique alternativement, dans les deux hypochondres, une injection de 2 grammes d'émulsion des moelles de 13 à 9 jours et un gramme des moelles plus virulentes, jusqu'à celles de 2 jours, triturées à la dose de un millimètre par centimètre cube de bouillon de veau stérilisé. J'emploie la seringue Strauss-Collin, à piston compressible en moelle de sureau, et je la fais stériliser à l'eau bouillante après chaque séance d'inoculation,

Depuis le 15 avril jusqu'à ce jour (1er août), huit personnes ont été traitées. Trois d'entre elles provenaient de Singapore et m'étaient adressées par le gouvernement de cette colonie ; une provenait de Malacca, et les quatre autres de la Cochinchine. Elles sont toutes en parfaite santé. Un coolie chinois, mordu en même temps que les trois premières d'entre elles, est mort de la rage 32 jours après la morsure.

L'existence de la rage chez l'animal mordeur a pu être expérimentalement affirmée dans quatre cas, soit parce que des inoculations effectuées avec son bulbe ont développé la rage chez des lapins, soit parce que des personnes mordues en même temps et non traitées ont succombé à cette maladie. Les quatre autres personnes ont été mordues par des animaux dont la rage n'a pas été expérimentalement reconnue, mais paraît très probable, d'après les renseignements fournis soit par les administrateurs de leur arrondissement, soit par un médecin.

Tant à cause de la profondeur des morsures de mes malades que du long temps écoulé avant leur arrivée à Saïgon (plus de 10 jours pour cinq cas sur les huit traités), j'ai cru préférable de les soumettre à des inoculations intensives calculées de telle sorte que les moelles virulentes de 8 à 2 jours étaient injectées durant 14 jours en trois séries complètes répétées.

Je continuerai dans l'avenir à me conformer à la même règle, puisque ses résultats se sont montrés excellents jusqu'à présent. Mais ma statistique est encore trop restreinte pour que j'insiste plus longtemps.

DOCUMENTS RELATIFS A LA RAGE HUMAINE CANINE EN INDO-CHINE

La première observation de rage humaine en Cochinchine a été écrite en 1870 par Lalluyeaux d'Ormay. M. Brouardel la cite dans un article du *Dictionnaire encyclopédique*. Bien que l'affirmation du diagnostic n'y soit pas formellement exprimée, la description des symptômes ne laisse aucune prise au doute. Il s'agissait d'un Annamite qui portait à la jambe les traces d'une morsure presque cicatrisée (*Arch. de méd. nav.*, t. XVI, 1871).

Ce fait est le seul qu'on trouve signalé dans les rapports médicaux anciens, qui ne font d'ailleurs mention que bien rarement des maladies observées chez les indigènes, à l'exception de la syphilis, du béribéri ou de la lèpre.

J'ai trouvé, en revanche, à l'hôpital militaire de Saïgon, l'histoire complète et inédite d'un Européen mort avec le diagnostic de *rage*. Elle date du 13 mars 1887, et se rapporte à un sous-brigadier de police, âgé de 31 ans, qui avait été mordu à l'aisselle, 44 jours auparavant, par un chien *malade*.

Les notes que j'ai reçues de l'intérieur du pays affirment toutes que la rage du chien s'observe un peu partout, avec les mêmes allures que nous lui connaissons dans les climats tempérés, et qu'elle se transmet également par morsures, du chien à l'homme et à d'autres animaux.

Voici à cet égard des renseignements très nets que je dois à l'obligeance du docteur Buisson, et qui ont été recueillis à Baria de la bouche d'un médecin annamite et conseiller d'arrondissement, nommé Liêm :

« On ne connaît, dans le pays, qu'une seule espèce de rage, correspondant à la rage furieuse. Au début, le chien qui en est atteint refuse de manger. La queue entre les jambes, la bave à la bouche, les yeux injectés, la marche chancelante, il ne craint plus les hommes et se jette sur eux ainsi que sur les chiens et tout ce qu'il rencontre. Il ronge tout, mais n'avale pas. Il ne se couche jamais. Un chien enragé est très difficile à tuer; il faut lui briser le crâne pour qu'il meure. Un chien mordu peut devenir très rapidement enragé. Les chiens mordus les premiers sont plus vite pris de rage que ceux mordus en dernier lieu : la virulence s'éteint peu à peu. C'est un venin caché dans la dent qui communique la rage. L'homme mordu contracte la maladie et devient enragé : il a peur de l'eau, peur des hommes, se retire dans un coin obscur pour ne pas voir la lumière. Le bruit lui est désagréable. Il dort peu, d'un sommeil très léger et continuellement troublé par des rêves. Il meurt paralysé. Un homme mordu depuis un an est devenu enragé. Le plus souvent, la maladie paraît au bout de deux à trois mois. Toutes les personnes mordues ne deviennent pas enragées. »

La fidélité de ce tableau est presque parfaite. Je n'y trouve guère à relever qu'une erreur : le médecin annamite méconnaît l'existence de la

rage muet du chien, et cette forme de la rage se trouve être de beaucoup la plus commune, d'après mes propres constatations et d'après l'expérience de M. le vétérinaire d'artillerie Duchêne, qui a eu l'occasion d'en observer plusieurs cas tout récemment.

D'autres faits aussi probants ont été recueillis par mes collègues, les docteurs Depasse et Marchoux, dans leurs tournées de vaccine ambulante. Je renonce à les citer tous, tant ils sont déjà nombreux. A Tu-Diêm, dans l'arrondissement de Long-Xuyen, plusieurs cas de rage humaine se sont déclarés en 1889. Les arrondissements où la maladie paraît le plus répandue sont ceux de Vinh-Long, Thudaumot et Bentré. A Baké, près Vinh-Long, l'année dernière, trois cas de rage canine se sont produits chez le chef de canton : une personne est morte entre le 90e et le 100e jour après. En 1880, des chiens enragés ont été tués à Thudaumot, et plusieurs personnes mordues sont mortes au bout de trois mois et dix jours. A Batri, arrondissement de Bentré, en 1890, une dizaine de chiens ont été atteints de rage, et cinq ou six personnes mordues ont succombé entre le 60e et le 100e jour. Depuis lors, le chef de canton fait tuer tous les chiens qui manifestent le moindre signe inquiétant et qui refusent de manger. D'après lui, les chiens enragés ont les yeux congestionnés, la queue tombante, les selles sanguinolentes, l'arrière-train paralysé. Ils ne mangent ni ne boivent, et la vue de l'eau provoque chez eux des spasmes du gosier.

En Annam, le docteur Sibaud, médecin des troupes d'infanterie de marine, m'a écrit qu'un missionnaire de Hué, le père Gallon, fut atteint d'hydrophobie il y a quelques années, et succomba après avoir été mordu par son propre chien, en voulant l'empêcher de mordre un Annamite. Cependant, la maladie serait assez rare, et les indigènes attribuent cette sorte d'immunité de leurs chiens à ce que ces animaux se nourrissent surtout d'excréments humains!

Du Tonkin, des renseignements nombreux et plusieurs observations très nettes m'ont été adressées par mon ami le docteur Paul Gouzien. Je citerai, entre autres, trois cas de rage humaine qui se sont produits à Viet-Tri, chez des militaires de la légion étrangère, les 5 et 8 juin et 10 juillet 1889. On n'a pu trouver sur aucun de ces hommes une trace de morsure, mais il paraît démontré que l'un d'eux, — le sergent dont il est question dans l'une des observations, — avait avec son chien des familiarités suspectes.

Ces faits ne sont pas les seuls qui aient été observés au Tonkin. Déjà, à diverses reprises, des Européens ont succombé à Hanoï même, à l'hydrophobie la mieux confirmée.

Le Dr Paul Gouzien m'a rapporté encore que, tout récemment, aux environs de Hong-Hoa, un médecin annamite et sa petite fille, mordus tous deux par un chat, qui avait été mordu par un chien fou, sont morts de rage peu après dans d'atroces souffrances. — Quelques mois plus tard, le petit garçon de ce médecin, mordu par un autre chien enragé, mourait également.

En ce qui concerne le traitement, presque tous les médecins annamites ou chinois et beaucoup de missionnaires européens prétendent connaître des

remèdes très efficaces contre l'hydrophobie, et ces remèdes seraient non seulement capables d'empêcher, dans la plupart des cas, l'éclosion de la maladie après morsure, mais encore de la guérir après qu'elle se serait manifestée. — J'ai réuni, à titre de curiosité scientifique, les renseignements qu'il m'a été possible de recueillir sur ce sujet.

En Cochinchine et au Tonkin, beaucoup de gens sont persuadés que toute personne mordue par un chien enragé est sûrement préservée de la mort si elle peut avaler cru et tout chaud le foie de l'animal abattu. Ce fait, assez singulier, est à rapprocher des expériences de Gohier, professeur à l'école vétérinaire de Lyon, qui, à l'encontre du résultat obtenu par les Annamites, prétendit donner la rage à des chiens en leur faisant manger de la viande provenant d'un cheval enragé. (*Mémoires et observations sur la médecine vétérinaire*, t. II, Lyon et Paris, 1816, — cité par Bouley *in Dict. encycl.*, art. *Rage.*)

Quoi qu'il en soit, ce remède ne jouit, en Cochinchine du moins, que d'une confiance assez limitée, et n'empêche pas que les individus mordus s'empressent de recourir ensuite aux remèdes complexes préparés par les médecins indigènes, tout en prenant soin de commander leur cercueil d'avance, par mesure de précaution. Les plantes médicinales qui entrent le plus communément dans ces remèdes sont :

Les graines d'une espèce de Datura que le P. Bon, missionnaire de l'évêché de Ke-So (Tonkin), rapporte à la variété *D. fastuosa*, dont les feuilles sont bien meilleures contre l'asthme que celles du *D. alba*, autre espèce commune dans le pays.

Et surtout le hoang-nan (*Strychnos Gautheriana*), qui croît abondamment dans les montagnes du pays de Baria, dans celles de l'Annam et du Tonkin.

La partie usitée de cette liane est l'écorce. On la râpe et on la mélange avec un peu de réalgar, de racine de réglisse et de corne de rhinocéros. On pile le tout ensemble, en y ajoutant quelquefois le thorax de quelques insectes mylabres (*Mylabris bimaculata*), aux élytres tachetées de blanc et de brun rougeâtre, et on en forme des pilules dont le malade doit avaler une assez grande quantité, jusqu'à production d'accidents convulsifs : il est alors préservé de toute atteinte d'hydrophobie.

Malheureusement l'efficacité de ce remède a été démentie bien des fois depuis que l'emploi du hoang-nan s'est répandu en Indo-Chine. Il n'en meurt pas moins un nombre relativement considérable d'individus, par suite des morsures d'animaux enragés, et les missionnaires eux-mêmes sont les premiers à reconnaître, surtout au Tonkin (berceau du hoang-nan), que cette maladie tend à faire plus de ravages chaque année dans une foule de centres populeux de l'intérieur du pays.

STATISTIQUE

DE

L'INSTITUT ANTIRABIQUE MUNICIPAL DE TURIN

PAR M. BORDONI UFFREDUZZI

L'Institut antirabique municipal de Turin a commencé à fonctionner le 30 septembre 1886.

Depuis ce jour, jusqu'au 30 juin 1891 (4 ans et 9 mois), 1,794 personnes mordues se sont présentées à l'Institut : sur ce nombre, 1,344 seulement ont été soumises au traitement par la méthode de M. Pasteur ; les autres, 450, n'ont pas été admises, parce qu'il avait été démontré que le chien mordeur n'était pas enragé.

Voici la statistique de notre Institut, dressée d'après la méthode suivie à l'Institut Pasteur, répartissant en trois catégories, A, B, C, les personnes traitées :

La première catégorie (A) comprend les personnes mordues par un chien dont la rage a été démontrée expérimentalement par la mort de l'animal ou par celle d'autres personnes mordues en même temps ; la seconde catégorie (B), les personnes mordues par un chien dont la rage a été constatée cliniquement ; la troisième (C), les personnes mordues par un animal suspect de rage, c'est-à-dire les cas douteux.

Relativement à la partie du corps sur laquelle portaient les morsures, les personnes soumises au traitement ont été aussi divisées en trois catégories : la première comprend les morsures portant sur la tête ; la seconde, celles portant sur d'autres parties découvertes (habituellement les mains et les pieds) ; et enfin la troisième comprend les morsures faites sur les parties couvertes par les vêtements.

Le 1er tableau indique le mouvement général de l'Institut depuis le jour de son ouverture jusqu'à la fin du mois de juin

1891, c'est-à-dire le nombre total des personnes traitées et des morts, répartis par catégories, la mortalité pour chacune de ces dernières, et enfin le *quantum* de la mortalité.

Ce dernier chiffre (pour 1,344 personnes traitées) est d'environ 1,40 0/0.

1er TABLEAU

ANNÉES	CATÉGORIES	PERSONNES MORDUES à la tête		PERSONNES MORDUES sur des parties découvertes		PERSONNES MORDUES sur des parties couvertes		TOTAUX	
		traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts
1886 (3 derniers mois)	A	2	—	13	1	2	—	17	1
	B	2	—	5	—	4	—	11	—
	C	—	—	4	—	2	—	6	—
1887	A	11	—	73	5	34	—	118	5
	B	10	1	54	—	22	—	86	1
	C	—	—	14	—	13	—	27	—
1888	A	8	—	53	—	45	—	106	—
	B	12	—	53	3	72	—	137	3
	C	—	—	5	—	6	—	11	—
1889	A	12	—	95	1	49	—	156	1
	B	3	—	55	2	31	—	89	2
	C	1	—	9	—	6	—	16	—
1890	A	10	2	85	1	44	—	139	3
	B	10	—	114	2	67	—	191	2
	C	1	—	20	—	3	—	34	—
1891 (6 premiers mois)	A	8	—	47	—	36	1	91	1
	B	4	—	40	—	22	—	66	—
	C	3	—	29	—	11	—	43	—
Totaux		97	3	768	15	479	1	1344	19
Mortalité %		3.03		1.90		0.20		1.40	

Notre statistique doit pourtant être partagée en trois parties, correspondant à trois périodes marquées par les dates des diverses modifications introduites dans le traitement, soit :

Une première période (2e tableau), du 30 septembre 1886 au 30 avril 1887, qui comprend 81 personnes traitées par la méthode appliquée au début par M. Pasteur, légèrement modifiée pour les cas les plus graves.

2e TABLEAU

(Première période du traitement)

ANNÉES	CATÉGORIES	PERSONNES MORDUES à la tête		PERSONNES MORDUES sur des parties découvertes		PERSONNES MORDUES sur des parties couvertes		TOTAUX		MORTALITÉ 0/0
		traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	
1886 (3 derniers mois)	A	2	—	13	1	2	—	17	1	
	B	2	—	5	—	4	—	12	—	
	C	—	—	4	—	2	—	6	—	
1887 (4 premiers mois)	A	4	—	11	1	3	—	18	1	
	B	2	—	8	—	8	—	18	—	
	C	—	—	7	—	4	—	11	—	
Totaux		10	—	48	2	23	—	81	2	2.46

Une deuxième période (3e tableau), du 1er mai 1887 au 31 juillet 1890, qui comprend 925 personnes soumises au même traitement rendu plus intensif par l'augmentation de la quantité de virus inoculé.

3e TABLEAU

(Deuxième Période du traitement)

ANNÉES	CATÉGORIES	PERSONNES MORDUES à la tête		PERSONNES MORDUES sur des parties découvertes		PERSONNES MORDUES sur des parties couvertes		TOTAUX		MORTALITÉ 0/0
		traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	
1887 (8 derniers mois)	A	7	—	62	4	31	—	100	4	
	B	8	1	46	—	14	—	68	1	
	C	—	—	7	—	9	—	16	—	
1888	A	8	—	53	—	45	—	106	—	
	B	12	—	53	3	72	—	137	3	
	C	—	—	5	—	6	—	11	—	
1889	A	12	—	95	1	49	—	156	1	
	B	3	—	55	2	31	—	89	2	
	C	1	—	9	—	6	—	16	—	
1890 (7 premiers mois)	A	4	2	60	1	35	—	99	3	
	B	5	—	67	2	36	—	108	2	
	C	—	—	8	—	11	—	19	—	
Totaux		60	3	520	13	345	—	925	16	1.72

Une troisième période (4e tableau) enfin, du 1er août 1890 au 30 juin 1891, qui comprend 338 personnes traitées par la même

méthode rendue encore plus intensive par la quantité de substance inoculée.

4e TABLEAU

(Troisième période du traitement)

ANNÉES	CATÉGORIES	PERSONNES MORDUES à la tête		PERSONNES MORDUES sur des parties découvertes		PERSONNES MORDUES sur des parties couvertes		TOTAUX		MORTALITÉ 0/0
		traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	traitées	morts	
1890 (5 derniers mois)	A	6	—	25	—	9	—	40	—	
	B	5	—	47	—	31	—	83	—	
	C	1	—	12	—	2	—	15	—	
1891 (6 premiers mois)	A	8	—	47	—	36	1	91	1	
	B	4	—	40	—	22	—	66	—	
	C	3	—	29	—	11	—	43	—	
Totaux		27	—	200	—	111	1	338	1	0.29

L'efficacité de ces modifications, introduites successivement dans sa méthode de traitement par M. Pasteur lui-même, est prouvée d'une façon évidente par le taux de la mortalité, qui s'est abaissée graduellement jusqu'à un chiffre assez bas.

En effet, la mortalité qui, pour la première période, était de 2,46 0/0, descend dans la deuxième à 1,72 0/0 et ne dépasse pas, jusqu'à présent [1], 0,29 0/0 dans la troisième.

Ces faits sont une nouvelle preuve de la valeur réelle de la *méthode Pasteur* pour le traitement préservatif de la rage, puisque les insuccès deviennent toujours plus rares à mesure que la méthode même se perfectionne.

1. Cette statistique, faite le 15 août sur la demande du comité du Congrès d'hygiène à Londres, n'a pas subi de changements jusqu'à ce jour (15 octobre). Il y a en ce moment plus de trois mois écoulés depuis le terme où elle s'arrête, et mes observations, conformes à celles de Paris, montrent que la presque totalité des insuccès se manifeste pendant cette période. Un insuccès de plus ne modifierait du reste pas la conclusion générale de ma statistique.

STATISTIQUE

DE

L'INSTITUT ANTIRABIQUE MUNICIPAL DE PALERME

Par MM. les Docteurs

L. DE BLASI ET J. RUSSO-TRAVALI.

Nous avons déjà été assez heureux l'an dernier pour n'avoir à signaler aucun insuccès parmi nos vaccinés. Il en est de même cette année-ci. Presque tous les *Sindaci* (maires) de la Sicile ont répondu à notre circulaire demandant des nouvelles des personnes traitées. Aucun ne nous signale de cas de mort, bien que cinq mois se soient écoulés depuis que nous avons congédié nos derniers malades. C'est peut-être à cause du soin que nous avons apporté au traitement des cas graves. En tout cas, nous croyons avoir répondu à la confiance croissante que rencontre la méthode Pasteur.

Il est pourtant un trop grand nombre de mordus qui n'ont pas recours à nous, soit par indolence, soit parce qu'ils croient davantage à une visite au couvent de *San-Vito*, pour les préserver des conséquences de la morsure. Notre enquête annuelle nous a révélé dix décès par hydrophobie survenus dans l'île, l'an dernier, et nous ne les connaissons sûrement pas tous.

Voici notre statistique, résumée dans un seul tableau.

Statistique des personnes traitées du 1er mars 1890 à la fin de février 1891 :

Morsures au visage.....	14	120 dont 36 cautérisées et 84 non caut.				
— aux mains.....	90					
— aux avant-bras....	7					
— aux jambes.....	9					
— sur des parties couvertes.		94	— 34	—	60	—
Total.....		214	— 70	—	144	—

La moitié environ des cautérisations a été faite au fer rouge.

Les cas où l'hydrophobie de l'animal mordeur était certaine se subdivisent ainsi :

Morsures au visage.....	10	dont	3	cautérisées et	7	non caut.
— aux mains.....	50	—	16	—	34	—
— aux avant-bras.....	4	—	3	—	1	—
— aux jambes.....	5	—	1	—	4	—
— sur parties couvertes..	55	—	19	—	36	—
Total.....	124	—	42	—	82	—

La rage de l'animal mordeur était donc sûre dans 124 cas sur 214, soit dans 58 0/0 des cas environ.

Nos mordus comprenaient 183 hommes et 31 femmes, dont 132 en provenance de la province de Palerme. Quant à l'animal mordeur, c'était le chien dans 193 cas, le chat dans 9, l'âne dans 5, le mulet dans 2, le veau dans 4, et enfin le furet dans un cas.

On voit que le chiffre des personnes qui sont venues se soumettre au traitement prophylactique est supérieur à celui des années précédentes. Nous avions, en effet, vacciné 131 personnes dans la première année (de mars 1887 à février 1888), 161 dans la seconde année et 156 dans la troisième. En tout, dans les quatre ans d'existence de l'Institut, nous avons traité 662 personnes, dont 4 seulement ont succombé. C'est une mortalité de 0,60 0/0.

Encore faut-il remarquer que sur ces quatre insuccès, deux se rapportent à la première période du traitement, celle dans laquelle on ne dépassait pas l'inoculation de la moelle de cinq jours. Nous sommes maintenant plus hardis, et la mortalité, qui avait été de 1,52 0/0 dans la première année, est descendue à 1,24 0/0 la seconde, et à zéro la troisième et la quatrième.

Nous avons pourtant eu des cas de morsure très graves, soit pour le siège, soit pour le nombre. Nous pourrions citer huit cas de morsures profondes au visage, dont un où il y avait 33 morsures non cautérisées; quatre cas de morsures aux membres, dont un avec 38 blessures aux mains, et enfin un cas de morsures au visage et aux mains où on comptait 8 blessures à la main gauche, une au bras gauche, deux à l'oreille droite, deux au sourcil droit, trois au sourcil gauche et deux à la région frontale à gauche. Tous ces malades sont aujourd'hui en bonne santé.

La mortalité totale peut être répartie suivant le siège des morsures : sur 42 individus mordus à la tête, elle est de 2,38 0/0 ; sur 300 individus mordus aux mains, elle est de 0,67 0/0 ; sur 320 individus mordus aux membres et au tronc, elle est de 0,31 0/0.

Nous avons, en outre, eu à relever deux cas de mort survenus pendant le traitement. Nous en avons relaté un dans le compte rendu de l'année 1889[1]. Voici brièvement l'histoire de l'autre.

Drago, *Vincent*, paysan de Tripi, se présente à l'Institut le 19 décembre 1890 ; il avait été mordu le 18 novembre au petit doigt gauche ; le morceau avait été enlevé et avait laissé l'os à nu. Imprudemment, il avait attendu, pour venir se faire traiter, que trois chiens, mordus en même temps que lui, aient présenté les premiers symptômes de l'hydrophobie. On l'accepte et on cherche à lui faire un traitement intensif. Mais au 12e jour se manifestent du malaise, des douleurs qui, du doigt mordu, s'irradient à tout le membre : on insiste sur le traitement dans la pensée qu'il ne s'agissait encore que d'un cas de rage nerveuse, comme en ont observé Laveran, Chantemesse et Raymond. Les symptômes en progressent, en effet, lentement, si bien que le malade peut encore venir à l'inoculation le 3 janvier, mais on juge alors utile de le faire entrer à l'hôpital, où, malgré la continuation du traitement intensif, il meurt deux jours et demi après, c'est-à-dire six jours après l'apparition des premiers symptômes. Il semble bien qu'ici le traitement commencé ait conféré au malade une résistance peu ordinaire contre les effets de la morsure.

En terminant, nous tenons à dire que nous ne voyons qu'un hasard heureux dans le fait de n'avoir constaté aucun cas de mort parmi nos vaccinés depuis deux ans. Il est impossible d'espérer toujours un pareil succès, car le traitement est une vaccination, une communication artificielle d'immunité, et, en fait d'immunité pathologique, jusqu'à présent, nous ne connaissons rien d'absolu.

1. *Riforma medica*, avril 1889.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR DE LA SOCIÉTÉ MÉDICALE DE CHARKOW, EN 1890

PAR M. LE Dr WYSOKOWICZ.

Le nombre des personnes traitées contre la rage a été à Charkow, en 1890, de 291, il avait été de 248 en 1889. Sur ce nombre, il y avait 180 hommes et 111 femmes. Le tiers environ des mordus avait moins de dix ans. Juin, juillet et août sont les mois les plus chargés.

Le tableau ci-joint donne une idée de la place et de la gravité des morsures. La colonne A comprend les cas où la rage de l'animal mordeur a été démontrée par des inoculations au lapin ; la colonne B ceux où la rage a été certifiée à la suite d'un examen vétérinaire. La colonne C comprend les cas où la rage était seulement probable, d'après les renseignements fournis, et la colonne D ceux où elle est restée douteuse et où on a pourtant vacciné, pour tranquilliser le malade.

	A	B	C	D
Morsures à la tête et au visage ... simples	1	2	4	—
Morsures à la tête et au visage ... multiples	2	4	11	2
Morsures cautérisées	—	1	3	—
— *non cautérisées*	3	5	12	2
Morsures aux membres supérieurs ... simples	19	9	24	1
Morsures aux membres supérieurs ... multiples	21	17	54	8
Morsures cauterisées	8	10	16	4
— *nonc autérisées*	32	16	62	5
Morsures aux membres inférieurs et au tronc. ... simples	5	4	16	1
Morsures aux membres inférieurs et au tronc. ... multiples	5	5	28	3
Morsures cautérisées	1	1	16	1
— *non cautérisées*	9	8	28	3
Morsures multiples aux divers points du corps	11	7	19	2
Morsures cautérisées	—	1	6	1
— *non cautérisées*	11	6	13	1
Habits déchirés	16	15	57	7
Morsures à nu	49	33	99	10
Totaux	65	48	156	17

L'animal mordeur a été le chien dans 256 cas ; le chat dans 25 ; le loup dans 2 ; le cheval dans 2 ; la vache dans un cas.

Sur ces 291 cas, il n'y en a eu que 3 mortels, à savoir :

1° K..., paysan, âgé de 25 ans, mordu le 6 juillet par un loup, et arrivé avec 16 plaies, dont 6 très profondes, aux bras et aux mains. Depuis le 11 jusqu'au 21 juillet on lui fit 22 injections, de quatre séries de moelles. Revenu chez lui, il mourut au bout de quelques jours.

2° O..., Cosaque, 30 ans, mordu au poignet droit par un chat enragé, le 25 juillet, traité du 1er au 7 août, et mort le 17 septembre. Un lapin, inoculé avec sa moelle, est mort en 18 jours.

3° P..., femme cosaque, 60 ans, portant à la jambe gauche 4 plaies profondes, provenant de la morsure d'un chien enragé. Le traitement a commencé 12 jours après la morsure et a duré du 8 au 14 juillet. Rentrée chez elle, P... est morte au bout de quelques jours, sans qu'on ait pu préciser la nature de sa maladie. En comptant ce cas comme un insuccès, la mortalité est à peu près de 1 0/0.

Il est vrai que, comme je le disais l'an dernier, il faudrait attendre au moins la fin de 1891 pour parler des résultats du traitement en 1890. Mais une année de plus écoulée n'a rien changé aux résultats de 1889 publiés l'an dernier.

Pour avoir des renseignements sur les mordus, j'ai été obligé de m'adresser aux gouverneurs des districts. Des feuilles individuelles dont j'avais muni chacun des malades traités, au moment où il rentrait chez lui, et avec prière de nous transmettre de ses nouvelles, il n'en est revenu qu'un tiers.

Nous avons, à la fin de l'année dernière, un peu modifié la méthode de traitement. Au lieu de deux séries de moelles atténuées, nous en avons employé trois, sans augmenter, dans les cas ordinaires, la durée du traitement, qui comprend 7 jours, et comporte de 13 à 14 vaccinations en tout.

Ordinairement, on fait une première série avec les moelles de 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 et 2 jours ; une seconde avec les moelles de 4, 3 et 2 jours, et une troisième avec les moelles de 3 et 2 jours ; en tout 13 vaccinations à 2 par jour, matin et soir. Dans les cas exceptionnels, on porte à 9-10 jours la durée du traitement, et alors on ne vaccine qu'une fois par jour les 2 ou 3 derniers jours.

OBSERVATIONS BACTÉRIOLOGIQUES

SUR LES FURONCLES DU CONDUIT AUDITIF EXTERNE,

NOTE DE MM. LES DOCTEURS

ARNALDO MAGGIORA ET GIUSEPPE GRADENIGO.

(Laboratoire d'hygiène de l'Université royale de Turin.)

Pendant le cours de cette année, nous avons eu l'occasion d'étudier au point de vue bactériologique plusieurs cas de furoncles et quelques cas de furonculose diffuse du conduit auditif externe.

Dans cette dernière affection se fait, comme on sait, un développement contemporain ou successif de plusieurs furoncles, qui laissent facilement des ulcérations à cours subaigu et quelquefois décidément chronique.

Dans la plupart des cas, il nous a été possible de constater, comme facteur étiologique important, l'habitude des malades d'introduire dans le conduit auditif externe des objets durs (plumes, cure-dents, etc.), dans le but d'enlever du cérumen, ou à cause d'une démangeaison habituelle, provoquée assez souvent par un eczéma chronique du conduit.

Ce fait tendrait à confirmer l'hypothèse de Schimmelbusch (12), selon laquelle, pour la production des furoncles, il est nécessaire que les microbes pathogènes soient introduits dans les follicules pilaires ou dans les petits conduits glandulaires par un frottement local plus ou moins énergique.

Il ne nous a pas été possible dans nos observations de rencontrer une plus grande fréquence des furoncles du côté droit, en comparaison du côté gauche; ce que l'on aurait pu *a priori* soupçonner à cause de la facilité plus grande que l'on a de se servir

de la main droite pour introduire des corps étrangers dans le conduit auditif et en frotter la surface.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être brièvement formulés de la façon suivante : dans le plus grand nombre de cas nous trouvâmes le *Staphylococcus pyogenes aureus :* tout de suite après, par ordre de fréquence, venait le *Staph. albus* et ensuite le *citreus.*

Dans deux cas nous rencontrâmes ensemble le *citreus* et le *albus :* — dans un cas enfin nous trouvâmes avec le *Staph. p. albus* beaucoup de colonies de *bacillus pyocyaneus.*

Quant à la variété ou race à laquelle appartenait le microbe pyocyanique que nous avons isolé, nous croyons utile de donner quelques renseignements, d'autant plus que les récentes recherches de Gessard[1] ont notablement modifié les idées que l'on avait auparavant à ce sujet.

Le bacille que nous avons trouvé, étudié sur les milieux nutritifs proposés par Gessard, se signala comme devant appartenir à la race A du même auteur, c'est-à-dire qu'il produisait pyocyanine et fluorescence verte. — Nous en fîmes en même temps des cultures sur les milieux nutritifs ordinaires, et nous avons vu que celles sur gélatine, aussi bien que celles sur pommes de terre, sur gélose, dans le bouillon et dans le lait, coïncidaient exactement, par leurs caractères, avec les cultures que Ernst a décrites[2] pour son bacille B ; ce qui nous a donné la conviction que le bacille B de Ernst appartient précisément à la race A de Gessard[3].

Nous avons aussi cultivé notre bacille sur trois des milieux

1 Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. IV, 1890, page 80). — Des races du bacille pyocyanique (*Ibid.*, t. V, 1891, page 66).

2. *Ueber einen neuen Bacillus d. blauen Eiters. Zeitschrift f. Hygiene.* Bd. II, 1887, page 369.

3. Comme on sait, M. Gessard a obtenu quatre races principales de bacille pyocyanique dont la première, A, donne pyocyanine et fluorescence, la seconde, P, seulement pyocyanine, la troisième, F, seulement fluorescence, tandis que la quatrième, S, ne donne ni l'une ni l'autre. — L'un de nous a isolé plusieurs fois des selles de malades de dysenterie épidémique un microbe pyocyanique dont les caractères biologiques, relatifs à la production des substances colorantes, coïncidaient exactement avec ceux de la race F, de Gessard, et dont les cultures sur les milieux ordinaires avaient les mêmes caractères que ceux décrits par Ernst pour le microbe pyocyanique (A. Maggiora, *Alcune osservazioni microscopiche e batteriologiche fatte durante una epidemia di enterocolite dissenterica. — Giornale della R. Accademia di medicina di Torino*, anno 1891, nos 7 et 8).

nutritifs ordinaires sur lesquels Ernst ne l'avait pas essayé, c'est-à-dire dans le sérum, et dans les solutions nitriques et ammoniacales de Frankland[1].

Sur le sérum, le bacille se développe promptement en le fluidifiant et en le colorant, d'abord en vert jaune, après en vert foncé, et ensuite, dans les vieilles cultures, en brun rougeâtre.

Dans les solutions nitriques et ammoniacales, au contraire, il croît en produisant une belle fluorescence verte, et sans donner de la pyocyanine, tandis que sur la solution nitrique il se montre chimiquement actif.

En passant au filtre Chamberland les cultures au bouillon peptone et à la gélatine, l'on obtenait un liquide de couleur verte très foncée, qui répandait une odeur très vive analogue à celle des fleurs de tilleul ou d'acacia (*Robinia pseudoacacia*). La même odeur aromatique, mais moins intense et moins persistante, se retrouvait dans les cultures qui n'avaient pas été passées au filtre.

Quant aux caractères morphologiques, les éléments se présentaient ordinairement sous la forme de bâtonnets de 1 à 1,5 μ de longueur et de 0,7 à 0,8 μ de largeur ; en changeant les milieux nutritifs et la température, l'on obtenait des formes plus longues, et aussi légèrement recourbées, comme celles représentées par les figures 2e, 3e, 4e et 5e du mémoire de M. Charrin[2].

Nous observâmes les formes les plus longues dans les cultures sur pommes de terre, à la température de 37°3. Les éléments se coloraient avec la méthode de Gram.

Le bacille que nous avons isolé possédait une virulence notable[3] ; inoculé dans la cavité péritonéale à la dose de quelques gouttes (3 à 4) de culture, à la 2e génération en gélatine ou en bouillon, il tuait les petits rats blancs (*mus musculus albinus*), en 12 à 20 heures ; à la dose de 4 à 5 gouttes, les rats blancs

1. *Zeitschrift . Hygiene*, Bd. VI, page 376.

2. *La Maladie pyocyanique*, planche I, Paris, 1889, Steinheil.

3. Ernst n'a pas étudié les propriétés pathogéniques de son bacille B, et Frick, qui s'occupa aussi de cette question, non plus. (*Virchow's Archiv*, Bd. CXVI, pag. 266.) Nos observations prouvent que la pathogénie du bacille B, ainsi dit, rentre dans la grande catégorie de la pathogénie du microbe pyocyanique qui a été si consciencieusement étudiée par les auteurs français Gessard, Charrin et autres. Les produits toxiques du microbe pyocyanique ont été encore récemment l'objet de quelques expériences physiologiques, par MM. Morat et Doyon (*Lyon médical*, tome LXVII, n° 22).

gros (*mus decumanus albinus*) ; et enfin à la dose de 8 à 10 gouttes les petits cochons d'Inde.

Tous ces animaux présentaient une réaction péritonéale plus ou moins accentuée ; leur sang contenait beaucoup de bacilles pyocyaniques, que l'on obtenait aussi par la culture du même sang.

Il y avait en même temps des altérations rénales plus ou moins graves et qui variaient d'une légère inflammation jusqu'à l'infarctus hémorragique.

Les mêmes espèces d'animaux succombaient aussi à la suite d'injections sous-cutanées à la dose de 5/10 à 8/10 de centimètre cube de culture. Les lapins, inoculés avec 1 centimètre cube de culture en bouillon, diluée dans le double de son volume de bouillon stérilisé, succombaient rapidement après 24 à 30 heures. Probablement à cause de la rapidité avec laquelle les animaux venaient à mourir, nous ne pûmes pas observer de cas de paralysie pyocyanique dans les animaux inoculés avec les cultures vivantes du microbe ; mais il nous a été possible de l'observer bien caractéristique dans les gros rats injectés avec des quantités considérables (8 à 10 centimètres cubes) de culture filtrée selon la méthode Chamberland, et dont la stérilité avait été constatée par d'autres ensemencements. Deux rats, pesant respectivement 210 et 220 grammes, inoculés dans le péritoine avec 8 centimètres cubes chacun de ce même liquide, présentèrent, quelques heures après l'injection, une paralysie du train postérieur, qui dura presque deux jours, et ensuite disparut complètement, sans laisser aucune trace.

Pour les pigeons, le bacille se montra aussi pathogène : ces animaux succombaient dans l'espace de 4 jours à la suite de l'injection de 8 à 10 gouttes de culture sur gélatine dans les muscles pectoraux.

Nous avons enfin constaté une sensible diminution de virulence dans les vieilles cultures, et dans celles obtenues à la suite d'une longue série d'ensemencements.

De ce que nous avons exposé, il résulte que nos observations sur les furoncles ne sont pas entièrement d'accord avec celles de Lœwenberg (10) selon lequel le microbe que l'on y trouve plus souvent serait le *Staph. pyog. albus* ; mais elles confirment les résultats obtenus par Klein (11) et par Schimmelbusch (12)

qui, dans la plupart des cas, y rencontrèrent le *Staph. pyog. aureus*.

D'autre part, il ne semble pas que la présence du *bacillus pyocyaneus* dans les furoncles ait été jusqu'ici constatée.

Les recherches que nous avons faites à ce sujet doivent être considérées comme une contribution à l'étude de la présence du bacille pyrocyanique chez l'homme, étude qui, d'après les derniers travaux de M. Gessard, devrait être prise de nouveau en considération.

BIBLIOGRAPHIE BACTÉRIOLOGIQUE SUR LES FURONCLES

1. Pasteur. — *De l'extension de la théorie des germes à l'étiologie de quelques maladies communes* (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1880, t. 90, p. 1033).
2. — *Sur le coccus du furoncle* (*Bull. de l'Acad. de méd.*, 2e série, vol. 9, 1880).
3. Loewenberg. — *Recherches sur la présence de micrococcus dans l'oreille malade, etc.* (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1880, t. 91, pag. 555).
4. — *Le furoncle de l'oreille.* Paris, 1881.
5. Rosenbach. — *Mikroorganismen bei den Wundinfectionskrankheiten des Menschen.* Wiesbaden, 1884.
6. Payet. — *Ueber Mikroorganismen des eitrigen Zellgewebsentzündung des Menschen* (*Fortschritte d. Medicin*, 1882, n. 2).
7. Garré. — *Zur Ætiologie acut eitriger Entzundungen* (*Fortschr. d. Medecin*, 1885, n° 6).
8. Tricomi. — *I microorganismi della suppurazione, ecc.* Napoli, 1886, Decken.
9. Bochhart. — *Ueber die Ætiologie und Therapie der Impetigo, des Furunkels und der Sykosis* (*Monatshefte f. prakt. Dermatologie*, Bd. IV, 1887, n° 10).
10. Loewenberg. — *Etudes thérapeutiques et bactériologiques sur le furoncle de l'oreille* (*Union médicale*, 3e serie, année 1888).
11. Klein. — *Ueber einigen Bakterienbefunde bei Leicheninfection* (*Fortschritte der Medic.*, 1889, n° 12).
12. Schimmelbusch. — *Ueber die Ursachen der Furunkeln.* (*Archiv für Ohrenh.*, Bd. XXVII, 1889, page 252).
13. Steinhoff. — *Beobachtungen über Otitis externa crouposa.* — *V. Ziemssen und Bauer's Arbeiten.* Leipsig, 1890, page 138.

La bibliographie du microbe pyocyanique est exposée d'une façon complète dans les travaux que nous avons cités, de MM. Gessard, Ernst, Charrin.

ÉTUDE DE LA MORUE ROUGE

(BACTÉRIOLOGIE, HYGIÈNE, PROPHYLAXIE)

PAR M. LE Dr LE DANTEC,

Médecin de 1re classe de la marine.

I. — HISTORIQUE.

La morue rouge n'est pas, comme son nom pourrait le faire croire, une variété de morue. La coloration rouge est la caractéristique d'une altération qui envahit la morue salée. Toutes les morues sont blanches au moment où on les prépare et doivent rester blanches, si elles sont bien conservées. Une morue qui rougit est une morue altérée. Lorsque la coloration rouge est généralisée, la morue prend un aspect qui rappelle assez bien la chair du saumon.

L'altération rouge a été signalée de tout temps, mais pendant ces dix dernières années elle a augmenté d'une façon inquiétante. Certains auteurs prétendent que le tiers du poisson livré à la consommation a subi les atteintes du rouge, et que le commerce perd de ce fait une dizaine de millions par an. Empêcher le rouge d'envahir la morue serait donc rendre un grand service aux armateurs.

La question de la morue rouge n'a été l'objet d'études vraiment scientifiques qu'à partir de 1878. A cette époque, l'attention fut attirée aux États-Unis sur la coloration rouge que prenaient les morues, en séchant à l'air, pendant l'été. On chargea le professeur Farlow de rechercher les causes de cette coloration. Farlow constata sur la morue la présence d'un organisme coloré, le *Clathrocystis roseo-persicina*, et accusa le sel de Cadix de servir de véhicule à l'agent colorant.

A ce moment, la littérature médicale n'avait encore enregistré aucun cas d'intoxication par la morue altérée. Dans le courant de cette année (1878), à Sidi-Bel-Abbès, en Algérie, on constata un véritable empoisonnement à la suite d'un repas de morue altérée, servie aux troupes. Cent vingt-deux hommes furent plus ou moins intoxiqués, aucun ne mourut. Les symptômes observés étaient ceux d'une forte cholérine [1]. Mais l'examen de la morue saisie chez le fournisseur, montra qu'on avait affaire à une morue simplement altérée, non pas à de la morue rouge. A ma connaissance, il n'existe que trois cas d'intoxication provoquée par la morue rouge altérée. Le Dr Bertherand a signalé le premier à Alger en janvier 1884 [2]. M. Mégnin, qui avait examiné les échantillons envoyés d'Alger, conclut que le rouge était dû à une moisissure de la famille des *Protomycètes* et du genre *Coniothecium*. Un deuxième cas d'empoisonnement s'est produit à Saint-Pétersbourg, où Herman a constaté deux décès et cinq cas d'intoxication simple. En octobre 1884, un troisième cas d'empoisonnement multiple se produisit à Lorient, où deux cents hommes furent atteints : aucun ne succomba. Bérenger-Féraud, qui a fait la relation clinique de cet accident, n'incrimine pas le rouge, pourtant présent, mais plutôt l'altération putride de la morue [3]. Il rattache, après Fonssagrives, la coloration rose à la présence du *Penicillium roseum*.

En 1885, Gayon et Carles, dans une courte note à la Société d'hygiène publique de Bordeaux, disent avoir cultivé une bactérie chromogène qui pousse bien dans les milieux riches en sel marin.

En 1886, Layet, Artigalas, Ferré, de Bordeaux, inclinent à croire que le rouge est dû à la présence d'une *algue*.

En 1886-1887, dans plusieurs publications, le professeur Heckel, de Marseille, attribue, comme Farlow, le rouge de la morue au *Clathrocystis roseo-persicina*. Au lieu de donner au *Clathrocystis* une origine unique (le sel) comme Farlow, il le fait aussi dériver d'un élément, le *Sarcina morrhus*.

Enfin, Pellion, de Dinan, pour expliquer l'origine du rouge,

1. Schaumont, *Arch. méd. mil.*, 1878, p. 504.
2. *Journal de médecine et de chirurgie de l'Algérie*.
3. *Arch. méd. nav.*, janvier 1885.

fait jouer un rôle considérable aux sels déliquescents, en particulier au chlorure de magnésium.

En résumé, on a incriminé successivement, comme agent érythrogène de la morue, un *Clathrocystis*, un *Protomycetes*, un *Penicillium*, une *Bactérie*, une *Algue* et une *Sarcine*.

Je me propose dans ce travail :

1° De chercher le véritable agent colorant de la morue rouge ; de le prouver en faisant rougir de la morue blanche au moyen de cultures pures ;

2° D'étudier, en passant, les autres altérations chromogènes de la morue ;

3° De déterminer le rôle du rouge dans les cas d'intoxication ;

4° De chercher un moyen pour prémunir la morue contre l'invasion du rouge.

II. — DU ROUGE DE MORUE, SES DEGRÉS, SES MICROBES.

D'après l'étude attentive de nombreux échantillons de morue que j'ai eus entre les mains depuis 5 ans, je considère qu'il y a deux degrés dans le rouge. Le premier degré, que j'appellerai *morue rouge saine*, est caractérisé par la présence sur la morue d'un vernis non visqueux s'enlevant facilement, et laissant voir au-dessous une chair musculaire saine et ferme. Au microscope on trouve 3 variétés principales de micro-organismes : algue, bacilles et coccus.

Le deuxième degré, que j'appellerai *morue rouge altérée*, est caractérisé par une matière rouge visqueuse à réaction fortement alcaline et à odeur nauséabonde. Si l'on examine une petite parcelle de ce rouge au microscope, on ne voit que des coccus associés le plus souvent par groupes de 4, et affectant la forme de sarcines.

En chambre humide, on peut faire passer la morue du 1er degré au 2e degré. Cette transformation pour être complète exige 2 à 3 mois.

On aura rarement l'occasion, dans la pratique, de rencontrer le rouge du 2e degré, car la morue est le plus souvent jetée à cause de son odeur repoussante. Le 1er degré du rouge est au contraire assez fréquent.

1° *Algue.* — Lorsqu'on examine au microscope un fragment de rouge au 1er degré, l'attention est immédiatement attirée sur de grosses cellules en segments de sphère (fig. 1), mesurant 12, 15 et même 18 μ de diamètre. Ces cellules ont une teinte verdâtre très légère, difficile à percevoir, et contiennent souvent dans leur intérieur des granulations protoplasmiques. La présence de pigment verdâtre dans l'intérieur des cellules me porte à croire que l'on a affaire à une algue. Malgré la diversité des terrains employés,

Fig. 1.

Fig. 2.

je n'ai jamais pu obtenir cet organisme en culture pure. Je le cite en premier lieu parce que c'est lui qui frappe l'œil d'emblée et parce qu'on est porté à le prendre pour l'agent colorant. Il est très probable que c'est ce même organisme qui a été décrit sous les noms divers de *Clathrocystis*, de *Protomycetes* et d'*Algue*. Pour montrer que son pouvoir colorant est nul, il suffit de constater sa présence sur la morue absolument blanche. Or, comme l'a remarqué Calmette, en grattant avec une aiguille les interstices aponévrotiques d'une morue quelconque non altérée, on enlève toujours des spécimens de cet organisme. La conclusion est que son rôle doit être nul dans la coloration de la morue. Je donne quelques dessins de cet organisme pour mettre en garde l'observateur contre les mêmes erreurs qui ont déjà été commises.

2° *Bacille du rouge de morue.* — Lorsqu'on ensemence des tubes de gélatine avec des fragments de rouge du 1er degré, on constate qu'il ne pousse que des microbes vulgaires; aucune colonie érythrogène ne vient. Dans une boîte de Pétri, semée depuis 2 ou 3 mois et oubliée dans un coin, je remarquai un jour une colonie rouge qui avait poussé sur une colonie blanche déjà ancienne. En prélevant une petite parcelle de chaque colonie, je constatai que la colonie rouge était composée de bacilles mobiles

présentant une spore à l'une des extrémités, la colonie blanche ne renfermait que de petits coccus. Je séparai les deux micro-organismes par la méthode des plaques, et j'obtins ainsi des cultures pures de chaque microbe. Depuis cette époque, j'ai essayé diverses méthodes, pour obtenir d'emblée une culture pure; voici les deux procédés qui m'ont le mieux réussi :

1er *procédé*. On dilue avec soin un fragment de rouge du 1er degré dans une goutte de bouillon stérilisé; cette opération est indispensable à cause de la gangue visqueuse qui réunit les organismes.

On sème cette goutte de bouillon dans un tube de gélatine que l'on étale dans une boîte de Petri. Au bout de deux mois, on enlève par tranches la gélatine dans l'intervalle des colonies, c'est-à-dire là où rien n'a poussé. On sème ces tranches de gélatine dans un nouveau tube et on fait une deuxième plaque. Au bout de 8 jours, on obtient de belles colonies rouges contenant le bacille à l'état pur. C'est en un mot une méthode analogue à celle dont s'est servi Winogradsky pour isoler le ferment nitrique.

2e *procédé*. Le 2e procédé est moins long. J'ai pensé à utiliser la résistance particulière des spores vis-à-vis de la chaleur pour séparer le microbe érythrogène de la multitude d'autres microbes qui pullulent sur la morue. Je fis deux séries d'expériences : dans une première série, je soumis des cultures pures du bacille rouge à une température de 100 degrés pendant une minute, la moitié des tubes furent stérilisés. Dans une deuxième série je soumis les cultures à une température de 95 degrés pendant une minute. Tous les tubes restèrent féconds. Me basant sur cette dernière expérience, je renfermai, dans un tube de verre effilé capillaire, une petite parcelle de rouge dissociée dans de l'eau stérilisée, je fermai les deux bouts du tube à la flamme, et je plongeai le tout pendant une minute dans de l'eau à 95 degrés. Je semai ensuite sur plaque pour obtenir des cultures pures, car il peut exister sur la morue des espèces sporulées autres que le bacille érythrogène.

Le bacille du rouge (fig. 2), a des dimensions très variables, suivant les terrains de culture employés. Sur la morue il varie de 4 à 10, 12 μ et plus. Semé sur plaque, ses colonies apparaissent sous forme de disques d'un rouge pâle au centre et d'un rouge plus

foncé à la périphérie. Quelquefois la couleur rouge est uniforme. La colonie est à son complet développement vers le 12e jour, et n'atteint guère plus de deux millimètres de diamètre. Examiné dans une goutte d'eau suspendue, le bacille est mobile et présente presque toujours à son extrémité une spore brillante. Il offre donc la même particularité que le bacille du tétanos, mais il est beaucoup plus épais que ce dernier. Semé par piqûre dans un tube de gélatine, il liquéfie lentement celle-ci en entonnoir. C'est en strie sur gélatine que la culture vient le mieux ; elle apparaît sous forme d'une traînée rouge intense, liquéfiant très lentement le milieu solide. Lorsque la gélatine est préparée depuis un certain temps, elle n'est plus liquéfiée par ce bacille. Sur la gélose, la coloration rouge de la strie se détache moins bien à cause de l'opacité du substratum. Semé dans le bouillon, le bacille trouble rapidement le liquide, mais ne donne qu'un pigment grisâtre. Il est de plus à remarquer que ce micro-organisme fournit plus de matière colorante à la température ordinaire de 10 à 15 degrés qu'à la température de l'étuve. La pomme de terre est pour lui un mauvais terrain.

Il restait à prouver que ce bacille est bien la cause du rouge, en faisant rougir un fragment de morue au moyen d'une culture pure. Il est à remarquer que la morue stérilisée à l'autoclave et par conséquent ayant subi la cuisson, rougit moins bien que la morue fraîche crue. Du reste, en se servant de morue crue, on imite mieux ce qui se passe dans la nature. On prélève des morceaux de morue dans le filet, là où la chair musculaire est blanche, épaisse et presque indemne de microbes. On maintient le fragment de morue dans une atmosphère humide. Les tubes de Roux conviennent bien pour cette expérience : on introduit un peu de bouillon ou d'eau stérilisée dans la cuvette inférieure. La morue elle-même doit être légèrement humide, car elle ne rougit pas quand elle est bien sèche. La température ordinaire de 15 à 20 degrés est la plus favorable. Deux choses sont à noter : 1° la coloration rouge est plus intense sur le côté du fragment de morue qui avait été exposé au sel ; 2° le bacille fait moins de spores sur ce terrain naturel que sur les terrains artificiels employés en bactériologie.

Pour compléter l'étude de ce micro-organisme, il était nécessaire de rechercher le rôle qu'il avait pu jouer dans la patho-

génie des accidents provoqués par l'ingestion de morue altérée. Pour imiter le plus possible ce qui se passe chez l'homme, j'ai fait ingérer à divers animaux : chien, lapin, cobaye, tantôt des cultures pures, tantôt de la morue rougie; je n'ai jamais déterminé d'accidents. — Le cobaye est même resté insensible aux inoculations sous-cutanées ou intrapéritonéales.

En résumé, le bacille du rouge est un bâtonnet allongé, peu ou pas mobile sur la morue, son terrain naturel; sur les terrains solides artificiels, il est mobile et présente le plus souvent une spore à son extrémité. Cette spore peut résister à une température de 95 et même 100 degrés pendant une minute. Le bacille du rouge fournit plus de pigment à la température ordinaire qu'à la température de l'étuve; il se développe bien sur la gélatine qu'il liquéfie lentement; il colore la surface de la morue salée en rouge intense, et donne aux faisceaux musculaires un aspect saumoné caractéristique. Son ingestion ne produit aucun accident chez les animaux. Comme ce bacille n'a jamais été étudié jusqu'à présent, je propose de le désigner sous le nom de bacille rouge de Terre-Neuve[1], nom qui aura l'avantage d'indiquer sa propriété chromogène et sa provenance.

3° *Coccus du rouge de morue.* — Ce coccus existe déjà sur la morue rouge du 1er degré, mais il est en bien plus grand nombre sur la morue rouge du 2e degré; aussi vaut-il mieux s'adresser à cette dernière pour obtenir une culture pure du microbe. Celui-ci pousse avec peine sur les terrains artificiels ; il vit associé à d'autres microbes. Il mesure 3 à 5 μ de diamètre et présente quelquefois en son milieu un petit trait, indice d'un commencement de division. Le procédé de Winogradsky ne donne aucun résultat. Le hasard seul le fait rencontrer dans les cultures. Il faut faire des plaques nombreuses et, au bout de 3 ou 4 mois, peut-être trouvera-t-on une colonie sur laquelle il végète. Par des cultures successives, on finira par l'obtenir à l'état pur. Sur la gélatine en plaque, ses colonies ressemblent assez à celles du bacille rouge, mais elles n'atteignent jamais un diamètre aussi grand. Elles mettent plus de

1. C'est sur des échantillons rapportés de Terre-Neuve par mon collègue et ami Calmette que j'ai pu isoler le microbe du rouge.

temps à se développer, une quinzaine de jours environ, et mesurent rarement un millimètre en surface. Par piqûre dans un tube de gélatine, le développement est très lent. La pointe est plutôt jaunâtre que rouge. La tête du clou s'élève d'abord en monticule avant de s'étaler sur la gélatine. D'un rouge pâle au début, elle prend ensuite une coloration d'autant plus foncée que la culture est plus vieille. La gélatine n'est pas liquéfiée. Sur la gélose, le coccus se développe plus rapidement que sur la gélatine.

Ce micro-organisme présente un caractère assez particulier, c'est de donner beaucoup plus de pigment lorsqu'il est associé à un autre microbe. Inoculé sur un fragment de morue, il est incapable de le faire rougir s'il est seul, mais si on l'associe avec un petit coccus, liquéfiant la gélatine, qu'on rencontre souvent à côté de lui, il peut végéter sur ce terrain et produire une coloration rouge manifeste. Inoculé à diverses espèces animales (chien, lapin, cobaye), et par des voies différentes (ingestion, injection hypodermique, injection intrapéritonéale), il ne produit jamais d'accident.

Pour être complet, je dois citer deux autres micro-organismes que j'ai rencontrés incidemment dans quelques échantillons. C'est d'abord la levure rose (*Rosahefe*) que j'ai vue à l'état d'efflorescences rouges sur le sel. La levure rose peut faire rougir la morue, mais seulement à la température de l'étuve. Ensuite une moisissure rouge qui laisse sur la morue de petites granulations pigmentaires irrégulières.

III. — AUTRES MICROBES CHROMOGÈNES DE LA MORUE.

Quoique ce travail n'ait spécialement en vue que les organismes érythrogènes de la morue, je crois devoir dire quelques mots des autres microbes chromogènes que j'ai rencontrés. L'altération rouge, en effet, n'est pas la seule qui envahisse la morue. Ainsi, il est très fréquent de rencontrer des morues jaune paille. La coloration jaune d'or est beaucoup plus rare. Les altérations chromogènes de la morue sont donc multiples : seule la coloration rouge a fait l'objet de nombreuses publications. Les microbes que j'ai le plus souvent rencontrés sont les suivants :

1° Coccus jaune, 2 à 3 μ de diamètre. Les colonies de ce microorganisme se développent lentement sur la gélatine qu'elles ne liquéfient jamais. Elles sont jaune pâle à l'intérieur de la gélatine, plus foncées à la surface.

2° Coccus jaune d'or. Il mesure 2 μ, ne liquéfie pas la gélatine; ses colonies sont régulièrement jaune d'or sans caractères spéciaux; il trouble le bouillon en lui donnant une teinte légèrement ambrée.

3° Coccus couleur rouille. Se rencontre sur les morues très altérées. La couleur de ses colonies rappelle assez bien la coloration que l'on obtient en frottant un morceau de fer rouillé; il mesure 2 μ, ses colonies paraissent formées de cercles concentriques alternativement rouge sombre et rouge pâle.

IV. — INNOCUITÉ DE LA MORUE ROUGE.

Pour prouver l'innocuité de la morue rouge, je me baserai sur deux séries de faits :

1. Expériences sur les animaux. On a vu, à propos de l'étude de chaque organisme érythrogène, que j'ai essayé de produire, chez les animaux, des accidents d'intoxication sans avoir jamais observé de résultat positif. J'ai fait ingérer à des chiens des fragments de morue rouge, sans plus de succès. A la suite de l'empoisonnement des troupes de la marine à Lorient, M. Lejanne fit manger par un chien plus de 300 grammes de morue fortement rouge sans déterminer le moindre malaise chez l'animal.

2. Alimentation chez l'homme. En France, les populations pauvres recherchent la morue rouge à cause de son prix réduit. A Cayenne, j'ai eu l'occasion de constater la même innocuité de la morue altérée par le rouge. Dans cette ville, le *bacaliau* (c'est le nom que l'on donne à la morue à la Guyane) était refusé par les commissions de recettes dès qu'il était altéré par le rouge. Mais les commerçants le vendaient à la population nègre qui ne s'en trouvait pas plus mal.

Ainsi donc, expériences sur les animaux, alimentation chez l'homme, tout prouve que la morue simplement altérée par le rouge n'est pas toxique. Il n'en est pas de même de la morue putréfiée, que celle-ci soit rouge ou non. Dans ce cas, la morue

agit comme toutes les conserves alimentaires avariées. Et il est à noter que dans tous les empoisonnements par la morue, il est fait mention d'odeur putride.

V. — ORIGINE DU ROUGE.

Farlow, qui a fait les premières recherches sur ce sujet, attribuait le rouge de la morue à l'emploi du sel de Cadix. Après lui, les auteurs qui se sont occupés de la question ont répété la même assertion sans apporter de preuves.

J'ai essayé de cultiver le bacille rouge de Terre-Neuve sur du gros sel. Celui-ci n'a jamais rougi, quel que fût son degré d'humidité.

Un de mes regrettés collègues, Randon, a fait à Saint-Pierre-Miquelon une expérience qui semble exclure le sel du rôle d'agent propagateur du rouge : on a fait trois tas de morue : l'un a été salé avec du sel ordinaire, c'est le tas témoin ; un deuxième a été salé avec du sel stérilisé à 350 degrés ; un troisième avec du sel gemme. On a placé les trois tas dans les mêmes conditions d'aération et d'humidité. Les deux derniers tas sont devenus aussi rouges que le tas témoin.

La conclusion à tirer est que l'agent colorant ne provient pas du sel, puisque le tas salé avec du sel stérilisé a rougi.

Restent deux autres facteurs : 1° l'air et les brouillards intenses de Terre-Neuve ; 2° les locaux, les récipients, les instruments, etc., etc. Une expérience simple faite sur place trancherait faciment la question. Il suffirait d'exposer à l'air un tas de morue préparé avec du sel stérilisé et dans des récipients également stérilisés, les mains étant aseptiques. Si, malgré ces précautions, la morue rougissait, le rôle de l'air serait indéniable. Au contraire, si la morue restait blanche, il serait démontré que le rouge est une altération se propageant par les récipients qui servent à préparer et à conserver la morue. On conçoit que ces expériences ne peuvent être faites que sur place.

VI. — CAUSES DE LA FRÉQUENCE ACTUELLE DU ROUGE.

Je serai très bref sur cette question qui intéresse cependant l'Industrie. Randon l'explique de la façon suivante : La morue, pêchée sur les bancs et sur la côte de Terre-Neuve, arrive en France sous deux formes différentes : 1° comme morue sèche,

c'est-à-dire après avoir été salée et desséchée au soleil sur les *graves* de la côte ou de SaintPierre ; 2° comme morue verte, incomplètement préparée, plongée seulement dans le sel, depuis le moment où elle est tranchée : l'opération terminale du séchage étant pratiquée dans les sécheries de notre littoral. La morue verte est devenue plus abondante parce que le poisson a fui la côte et s'est réfugié sur le banc, où le desséchement immédiat du poisson est impossible. On part des bancs et on arrive à Saint-Pierre ; là, au lieu desécher le poisson, on l'empile dans les cales des navires *chasseurs* qui sont chargés de le rapporter en Europe. Nous avons vu que la dessiccation empêche la morue d'être envahie par le rouge ; les morues vertes se trouvent au contraire dans d'excellentes conditions d'humidité pour rougir. C'est la seule explication de la fréquence actuelle du rouge.

VII. — TRAITEMENTS CURATIF ET PROPHYLACTIQUE DU ROUGE.

Heckel est le premier en France qui ait émis l'idée d'un traitement curatif et d'un traitement prophylactique du rouge. Il a proposé, comme traitement curatif, le badigeonnage de la surface des morues avec une solution de chlorobenzoate de soude ou de chlorocinnamate à 18 0/0.

J'ai vu employer aux Subsistances de Lorient un procédé qui se recommande par sa simplicité. On se contente de brosser la morue dans l'eau avec une brosse de chiendent, puis on la fait sécher dans une chambre à 25 ou 30 degrés. Au bout de 24 heures la morue devient sèche et peut être livrée à la consommation. A la rigueur, après avoir brossé la morue, on pourra l'exposer simplement à un courant d'air.

La prophylaxie du rouge a beaucoup plus d'importance que le traitement curatif. Heckel a d'abord vanté l'hyposulfite de soude, puis le sulfobenzoate de soude qu'il mélange au sel dans la proportion de 5 0/0. J'ai cherché, en opérant sur des cultures pures, quelles étaient les substances qui entravaient le plus facilement le développement des microbes du rouge. D'après mes expériences, le borax est de beaucoup la substance la plus efficace, et j'ai appris depuis que les Américains et les Allemands se servaient aussi de poudres préservatrices à base de borax. En France, l'emploi de cette substance est interdit par le Comité

d'hygiène, il faut donc s'adresser à d'autres antiseptiques. Après le borax, viennent les substances suivantes : nitrate de potasse, hyposulfite de soude, carbonate de soude.

Randon, sur les conseils d'Heckel, a employé le bisulfite de soude : il fit placer à Saint-Pierre, dans un magasin où les morues rougissaient toujours, trois tas salés de la façon suivante :

N° 1, morue salée avec du sel ordinaire ;

N° 2, morue salée avec du sel bisulfité à 10 0/0 ;

N° 3, morue salée avec du sel bisulfité à 15 0/0 ;

Le n° 1 devint très rouge ; le n° 2 rougit très faiblement ; le n° 3 resta blanc.

Conclusion. — 1° Le rouge est une altération qui envahit la morue salée. On constate deux périodes dans le rouge. Dans la première, la coloration rouge est due à la présence d'un bacille ; la chair de la morue est saine ; en dissociant une parcelle de rouge on voit au microscope trois éléments prépondérants : bacilles, algue, coccus. Le bacille érythrogène est un bâtonnet mobile habituellement terminé par une spore comme le bacille du tétanos. En raison de ses propriétés chromogènes et de sa provenance, je propose de l'appeler bacille rouge de Terre-Neuve. Dans la 2e période, le rouge paraît plutôt dû à la présence d'un coccus qui, pour se développer, a besoin que la morue ait été préalablement altérée par d'autres espèces microbiennes. La chair musculaire s'effrite facilement. Au microscope, on ne voit plus que des éléments arrondis, le plus souvent en sarcines. Le rouge, à cette période, a une réaction fortement alcaline ;

2° L'altération rouge n'est pas la seule qui puisse envahir la morue : les variétés de coloration jaune, jaune paille, jaune d'or sont dues à la présence de micro-organismes particuliers ;

3° La morue, simplement altérée par le rouge, est inoffensive. Lorsque la morue altérée détermine des empoisonnements, ceux-ci relèvent des microbes saprogènes ;

4° La fréquence actuelle du rouge est due probablement à l'importation en France de la morue à l'état de morue verte ;

5° Le meilleur moyen de prémunir les morues contre le rouge est d'ajouter au sel marin un antiseptique tel que : bisulfite de soude, nitrate de potasse, hyposulfite de soude, etc., dans la proportion de 10 à 15 0/0.

LE CANTHARIDATE DE POTASSE

DANS LE

TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

PAR M. LE Dr J. DE CHRISTMAS

(Travail du laboratoire de chimie biologique à l'Institut Pasteur).

Dans la série de remèdes antituberculeux que cette année a vu naître, celui de la cantharidine en injections sous-cutanées s'imposait à des recherches expérimentales sur les animaux, autant à cause de l'autorité de son auteur, M. Liebreich, que par les résultats que ce savant et les médecins qui l'essayaient sous sa surveillance paraissent avoir obtenus dans le traitement de différentes formes de tuberculose, surtout dans le lupus et la tuberculose du larynx.

La cantharidine, dont les effets sur l'organisme humain sont des plus violents, ne peut être employée qu'à des doses très faibles, et les essais de M. Liebreich montrent qu'une dose au-dessus de 2 à 5 décimilligrammes peut déjà occasionner des congestions rénales. Voici comment on prépare la solution. La cantharidine pure n'étant pas soluble dans l'eau, il faut employer son sel potassique qu'on obtient en solution aqueuse en chauffant $0^{gr},2$ de cantharidine avec $0^{gr},4$ de potasse pure dans 20 centimètres cubes d'eau. La solution faite, on y ajoute peu à peu 980 centimètres cubes d'eau chaude, ce qui nous donne une solution de cantharidine contenant 2 décimilligrammes dans 1 centimètre cube d'eau.

Nous n'avons pas à nous occuper ici de l'emploi, dans la

thérapie humaine, de ce remède, préconisé du reste depuis fort longtemps en France comme expectorant et dans le traitement du psoriasis. Mais nous avons voulu nous rendre compte de son influence sur le processus tuberculeux, tel qu'il se développe chez le cobaye après l'injection sous-cutanée d'une faible quantité d'une culture de tuberculose humaine.

L'expérience a été faite sur un lot de dix cobayes, dont deux avaient déjà été inoculés avec de la tuberculose, deux mois et trois semaines avant leur mise en traitement. Sur les huit restant, six ont été inoculés le même jour sous la peau du ventre avec 0,1 centimètre cube d'une émulsion d'une culture de tuberculose humaine. Deux des six ont été gardés pour contrôle, les quatre autres ont été mis en traitement le jour même de l'inoculation. Les deux qui restent enfin ont subi le traitement comme les autres, mais ils n'ont pas été rendus tuberculeux.

Des essais antérieurs avaient montré que la dose de 2 décimilligrammes de cantharidine dans 1 centimètre cube d'eau — dose ordinairement bien supportée par l'homme — est trop forte pour les cobayes. Elle occasionne une inflammation du tissu sous-cutané, quelquefois suivie de nécrose de la peau, et de la formation d'un petit ulcère assez long à guérir. Il était donc nécessaire de diminuer la dose et nous nous sommes arrêtés à celle de 0,5 décimilligrammes dans 1 centimètre cube d'eau, dose qui est parfaitement supportée et qui n'occasionne aucun accident local ou général. La preuve en est dans les deux cobayes, qui ont reçu autant d'injections que les autres, mais qui n'ont pas été tuberculisés. Ces deux animaux sont aujourd'hui encore (six mois et après) en parfaite santé.

Les injections ont été faites tous les trois jours pendant trois mois dans le tissu sous-cutané, souvent dans la proximité de l'endroit de l'inoculation tuberculeuse.

L'effet de ces injections sur le procès tuberculeux a été absolument nul. La formation de l'ulcère tuberculeux au point de l'inoculation, le gonflement glandulaire, l'amaigrissement, bref tous les signes de tuberculose aiguë chez le cobaye ont suivi leur cours régulier, et la mort est arrivée sans différence sensible entre les animaux traités et non traités. Il y a même un des animaux de contrôle qui a vécu plus longtemps que les animaux traités.

Voici les détails de l'expérience.

		Date de l'inoculation.	Date de la mort.	Durée de la maladie.
I.	Animaux de contrôle non traités.	23 mars.	1er juillet.	99 jours.
II.			19 août.	149 —
III.	Inoculé dans l'œil.	5 janvier.	20 avril.	105 —
IV.	Inoculés sous la peau du ventre.	9 mars.	1er août.	145 —
V.		23 mars.	13 juillet.	107 —
VI.		*id.*	10 juin.	78 —
VII.		*id.*	5 août.	135 —
VIII.		*id.*	30 août.	159 —
IX.	Traités mais non inoculés.	Vivants.		
X.				

On a cessé les injections quand l'état avancé de la tuberculose montrait leur parfaite inutilité. Chaque animal a reçu trente injections, chacune de 0,5 décimilligrammes, ce qui donne une quantité totale de 1,5 milligrammes. Le poids moyen des cobayes employés étant de 500 grammes et le poids moyen de l'homme supposé 75 kilos, la dose de 1,5 milligrammes chez le cobaye correspond chez l'homme à l'énorme dose de 2,25 grammes de cantharidine.

Il y a un renseignement utile à tirer de ces expériences en dehors de celui de la complète inefficacité de ce traitement en ce qui concerne le cobaye, c'est la durée excessivement variable de la tuberculose chez cet animal. Tous les animaux, excepté deux, avaient été inoculés le même jour avec la même quantité de culture. Il n'y avait pas de différences bien sensibles dans leurs poids initiaux, qui variaient de 450 à 500 grammes, et pourtant les délais entre l'inoculation et la mort ont varié de 2 mois et demi à 5 mois.

Avis aux expérimentateurs qui se croient autorisés à déclarer les cobayes tuberculeux guéris après deux ou trois mois d'observation!

REVUES ET ANALYSES

A. MONTI. — Les bacilles de la fièvre typhoïde et les eaux potables de la ville de Pavie. *Riv. d'Igiena*, 1891.

Dans les puits, peu profonds, d'une maison et d'une caserne où sévissait la fièvre typhoïde, M. Monti a découvert des bacilles qu'il a soigneusement comparés aux bacilles d'Eberth, et qui, soumis aux mêmes épreuves, se sont comportés absolument de même. Il les a isolés en appliquant les méthodes de Vincent et de Parietti (v. ces *Annales*, t. V, p. 413). Il les a comparés au bacille d'Eberth en les cultivant sur plaques de gélatine, sur pomme de terre, sur lait coloré d'après la méthode de Noeggerath, sur gélatine à la pomme de terre suivant la méthode de Holz [1], qui consiste à additionner du suc de pommes de terre crues de 10 0/0 de gélatine, et à faire avec le tout un milieu transparent et solide fortement acide, sur lequel les microbes liquéfiants ne se développent pas, tandis que le bacille du typhus y donne des végétations abondantes et caractéristiques. Après avoir fait toutes ces comparaisons, qui témoignent de la ressemblance entre le bacille d'Eberth et celui des puits de Pavie, et de leurs différences avec le *bacillus coli communis*, M. Monti hésite à conclure. Il se laisse influencer par le scepticisme de l'école de Berlin. Il faut accepter tous les scrupules. Ce qui est surprenant, c'est que ceux qui les éprouvent ne cherchent pas à les faire disparaître en s'adressant à d'autres moyens de diagnostic que ceux que l'on donne jusqu'à présent. Si les aspects des cultures sur divers milieux laissent dans l'indécision, il n'y a qu'à chercher plus loin, et à attaquer franchement l'étude des propriétés biologiques des microbes. Il y a longtemps que les *Annales* soutiennent que c'est uniquement dans cette voie qu'on peut trouver le moyen de se décider dans les cas douteux. Les recherches de Rodet, de Vincent, de Chantemesse et Widal, de Noeggerath, de Kitasato, de Holz, d'Uffelmann, en s'ajoutant les uns aux autres, sont autant d'éléments de la question. S'ils ne suffisent pas, la chimie biologique fournit une mine inépuisable pour en trouver d'autres.

Dx.

1. *Zeitschrift, f. Hyg.*, t. VIII, 1890.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — SEPTEMBRE 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	2	3	»	4	6	»	3	8
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	1		»	2		»	5	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	3	»	»	2	»	»	5	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	3	»	»
Morsures aux mains { simples	»	9	16	»	21	43	»	3	6
Morsures aux mains { multiples	»	7		»	22		»	3	
Cautérisations efficaces	1	»	»	2	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	7	»	»	23	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	8	»	»	18	»	»	3	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	2	2	»	13	32	»	1	8
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	»		»	19		»	7	
Cautérisations efficaces	»	»	»	6	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	20	»	»	3	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	6	»	»	4	»	»
Habits déchirés	1	»	»	23	»	»	7	»	»
Morsures à nu	1	»	»	9	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	2	2		»	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	2	»	»	»	»	»
Habits déchirés	1	»	»	1	»	»	»	»	»
Morsures à nu	1	»	»	2	»	»	»	»	»
Totaux. { Français et Algériens		17	22		73	83		18	22
Totaux. { Etrangers		5			10			4	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					127				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 116 fois; chats, 7 fois; vaches, 2 fois; bœuf, 1 fois; veau, 1 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

5me ANNEE. NOVEMBRE 1891. N° 11.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES
SUR LA DESTRUCTION DES MICROBES
PAR LES
CELLULES AMIBOÏDES DANS L'INFLAMMATION,

PAR LE Dr ARMAND RUFFER.

(Laboratoires réunis des Collèges royaux des médecins et des chirurgiens de Londres.)

Dans un mémoire publié dans le *British medical Journal*[1], j'ai été conduit aux conclusions suivantes :

1° Les phénomènes inflammatoires, consécutifs à l'introduction du bacille du charbon symptomatique sous la peau du cobaye, ont un caractère protectif et utile :

2° La destruction des microbes au point d'inoculation est produite entièrement par les cellules amiboïdes, contenues dans l'exsudat inflammatoire.

Ces conclusions étaient basées sur des expériences faites avec des cobayes ; mais depuis j'ai étudié l'action du même virus du charbon symptomatique sur les lapins, animaux regardés comme réfractaires à cette maladie (Arloing, Cornevin et Thomas, Roux et Nocard, etc.). Dans ce qui va suivre, je me propose de

1. *British medical Journal*, 24 mai 1890.

donner un compte rendu d'expériences entreprises pour examiner l'effet qu'exercent les humeurs vivantes et les cellules des lapins sur le *bacillus Chauvœi*.

Les virus employés étaient le 1er et le 2e vaccins de M. Arloing, vaccins préparés par la dessiccation des muscles d'animaux morts du charbon symptomatique. La dose du virus était toujours soigneusement pesée avant d'être introduite sous la peau du lapin.

Ma première expérience me porta à croire que le *bacillus Chauvœi* ne se cultive pas dans les humeurs vivantes du lapin. Ayant introduit une petite quantité du 2e vaccin (0gr,005) sous la peau d'un lapin avec les précautions antiseptiques nécessaires, j'examinai le point d'inoculation 24 heures après, et ne pus constater la présence d'aucun bacille sur les préparations étalées, faites avec l'humeur prise en ce point. Cependant en colorant soigneusement des coupes, faites avec le tissu inflammatoire excisé au niveau de l'injection, je trouvai toujours quelques leucocytes, entourant les débris de la poudre vaccinale, et quelques bacilles typiques englobés dans des cellules. Si, au lieu d'injecter une si petite quantité de vaccin, j'en inoculais une plus grande (0gr,05), les bacilles étaient extrêmement nombreux au point d'inoculation. Des doses un peu plus fortes donnaient à l'animal le charbon symptomatique typique, et le tuaient inévitablement après 48 heures ou en trois jours. On constatait alors, au point d'inoculation, un très grand nombre de bacilles dont beaucoup étaient englobés dans les leucocytes et en voie de dégénérescence. Les changements dégénératifs de ces microbes étaient tout à fait semblables à ceux produits par les leucocytes des cobayes [1].

Deux faits sont nettement établis par ces expériences :

1° L'immunité du lapin vis-à-vis du *bacillus Chauvœi* est seulement relative et non pas absolue ;

2° Cette immunité relative n'est pas due seulement au manque de matière nutritive, car pourvu que la dose de virus introduit soit assez grande, le bacille se cultive très bien dans les tissus du lapin.

Ces faits me conduisirent à rechercher si les humeurs

1. Voir *British medical Journal*, loco citato.

vivantes des animaux, comparativement réfractaires au *bacillus Chauvæi*, avaient un pouvoir bactéricide sur ce même microbe, quoique cette question ait déjà été, à un certain point, élucidée par les excellentes recherches de mon ami M. Roger. Cet observateur éminent, fermement convaincu du pouvoir bactéricide et immunisant du sérum, a fait l'observation remarquable[1] que le sérum des cobayes, qui ne sont pas *réfractaires* au charbon symptomatique, a un fort pouvoir bactéricide envers le *bacillus Chauvæi*, tandis que le sérum des lapins, animaux relativement réfractaires, est inoffensif pour le même bacille. C'est là une confirmation de plus de ce fait qu'on ne peut pas juger de l'immunité d'un animal vis-à-vis d'une maladie, par le pouvoir bactéricide de ses humeurs mortes vis-à-vis du microbe de cette maladie.

J'ai déjà signalé autre part[2] le fait que, de même que le sang vivant diffère du sang mort par ses caractères optiques, chimiques et physiologiques, l'action des humeurs *vivantes* sur les microbes diffère complètement de celle des humeurs mortes.

En partant de ce principe que, pour étudier l'action des humeurs de l'économie sur un microbe, il faut observer cette action dans l'organisme vivant, j'ai adopté une méthode, employée antérieurement pour des expériences de même ordre par Metchnikoff et d'autres. Je renfermais la poudre à étudier dans un petit sac de papier à filtrer, fait comme ceux dont les pharmaciens se servent pour envelopper leurs poudres. Les deux replis du sac étaient seulement scellés l'un dans l'autre avec de la paraffine.

Je mettais dans le sac $0^{gr},5$ du 1er vaccin, et j'introduisais le tout, pendant 24 ou 48 heures, sous la peau d'un gros lapin. Je retirais ensuite le sac, j'examinais son contenu, et je plongeais le tout dans de l'alcool absolu pour le bien durcir.

L'aspect des préparations étalées, faites avec le contenu du sac, variait quelque peu. Si la préparation était faite avec la poudre contenue au centre du petit paquet, les nombreux bacilles qui s'étaient développés étaient, pour la plus grande partie, normaux, quoique la croissance de quelques-uns d'entre eux fût moindre que celle de leurs voisins. Les contours de

1. *Contribution à l'étude de l'immunité acquise*, page 1.
2. *British medical journal*, 24 mai 1890.

ces derniers bacilles étaient irréguliers, et leur coloration par la méthode de Gram moins intense, et souvent remplacée en partie par la coloration complémentaire de la vésuvine. Assez fréquemment on observait de longs filaments, dans lesquels quelques bacilles paraissaient parfaitement normaux et se coloraient en violet foncé par le violet de gentiane, tandis que d'autres avaient des contours irréguliers et se coloraient par la vésuvine.

Il est difficile de décider si les bacilles à contours irréguliers étaient en voie de dégénérescence, ou si on avait affaire à des microbes dont la croissance avait simplement été retardée. Cependant la seconde hypothèse me semble être la vraie, pour les raisons que voici.

Si on examine la poudre 48 heures après l'inoculation, ces formes irrégulières, au lieu d'être plus nombreuses, ne se rencontrent que rarement et peuvent même faire complètement défaut. Enfin si, au lieu d'examiner la portion centrale de la poudre, on étudie la raclure faite sur la surface du papier, on y trouve une quantité de bacilles courts, droits, épais et absolument normaux.

On rencontre par-ci par-là, à l'intérieur du sac, quelques leucocytes. C'est un fait important, car il réfute complètement l'objection faite à cette méthode, notamment que quelques-unes des matières chimiques bactéricides contenues dans le liquide exsudé, sont arrêtées par le papier. Il est certain que si un corps solide, tel qu'un leucocyte, peut traverser le papier, aucune substance chimique ne peut être retenue. On peut donc déjà conclure de ce qui précède que le *bacillus Chauvœi* se développe parfaitement dans les tissus des lapins réfractaires. La preuve de ce fait devient absolue si on fait soigneusement des coupes du papier du sac, après l'avoir durci dans l'alcool, le chloroforme, le chloroforme saturé de paraffine et enfin la paraffine pure [1].

L'examen de ces coupes démontre une grande activité des bacilles, car on voit qu'ils parviennent à se frayer un passage entre les fibres du papier et le traversent jusqu'à une certaine distance. D'un autre côté, les leucocytes, attirés par le poison

1. Ces coupes sont très difficiles à faire. Elles ont été faites et colorées au carmin et au violet, avec un très grand succès, par mon ami le Dr. J. H. Walker de Corwen.

sécrété par les microbes, pénètrent en quantité immense à travers les fibres du papier, de sorte qu'une rencontre entre les microbes et les leucocytes doit avoir inévitablement lieu à un certain point.

On voit alors que quelques leucocytes, ayant pris les devants, contiennent des microbes soit normaux, soit en voie de dégénérescence. D'autre part beaucoup de ces leucocytes ont eux-mêmes péri dans la lutte, comme on le voit clairement d'après les signes de dégénérescence qu'ils manifestent. Derrière cette avant-garde on trouve la masse des leucocytes contenant dans leur intérieur une masse énorme de bacilles plus ou moins dégénérés. Il est curieux de voir les petits leucocytes polynucléaires rassemblés en nombre énorme, juste aux endroits où leur présence est utile. Enfin, près de la surface externe de la coupe on ne trouve plus un seul bacille. Tous ont été arrêtés par les leucocytes.

L'observation suivante est digne d'intérêt à un autre point de vue. Ayant inoculé un lapin avec $0^{gr},005$ du 1er vaccin du charbon symptomatique enveloppé dans un sac en papier, je fus empêché de venir au laboratoire pendant quelques jours. En revenant le sixième jour, je trouvai l'animal en bon état.

Le sac en papier ainsi que les tissus environnants furent enlevés, durcis dans de l'alcool absolu et j'en fis des coupes, que je colorai par le carmin de M. Gerrard et le violet de gentiane. Je ne parvins à trouver aucun bacille dans toutes les coupes examinées. La cavité du sac était pourtant très reconnaissable, car elle contenait les débris de la poudre vaccinale et de nombreuses cellules amiboïdes, tandis que le tissu connectif nouveau s'était développé sur la surface externe du papier.

Je n'ai pas besoin de faire ici la description des microphages (petites cellules mono et polynucléaires) et des macrophages (grandes cellules ne contenant qu'un noyau vésiculaire) qui avaient envahi le papier. Il suffit de dire, que, contrairement aux descriptions de MM. Ballance et Sherrington [1], j'ai observé tous les stades de développement depuis les leucocytes jusqu'aux grandes cellules épithélioïdes. Le développement de ces cellules plasmiques, dans les productions *pathologiques*, est absolument

1. Sur la formation du tissu cicatriciel, *Journal de Physiologie*, 1889, p. 558.

identique au développement de ces mêmes cellules tel que je l'ai observé dans les tissus normaux (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer, amygdales, etc.). Non seulement le développement, mais la fonction de ces cellules épithélioides pathologiques ressemble à celle des cellules épithélioïdes physiologiques. Comme dans la rate et les ganglions lymphatiques normaux, de même dans le sac en papier introduit sous la peau, les macrophages englobent un grand nombre de petits leucocytes.

Outre les cellules mononucléaires, je trouvai dans le papier à filtrer, de vraies cellules géantes multinucléaires, ressemblant en tout aux cellules correspondantes de la tuberculose. Elles étaient formées par la fusion de plusieurs cellules épithélioïdes, et leur fonction paraissait être exactement la même que celle de ces cellules.

En examinant en effet soigneusement les cellules géantes, je vis que quelques-unes d'entre elles renfermaient des corps particuliers brillants, homogènes, irréguliers, jaunâtres, ne ressemblant en rien à quoi que ce soit appartenant à l'économie animale. Ces masses irrégulières n'étaient rien autre que du papier à filtrer englobé et en partie digéré par les cellules géantes. En certains endroits notamment, ces énormes macrophages avaient été fixés par le réactif, juste au moment où ils étaient en train d'absorber les fibres du papier; on pouvait alors observer la cellule géante englobant presque entièrement une fibre, dont une partie faisait encore saillie. Ce nouveau fait, ajouté à ceux décrits antérieurement par Soudakevitch, Metchnikoff et moi-même, démontre une fois de plus que la cellule géante n'est pas un corps affaibli et malade (Weigert, Koch), mais une cellule amiboïde excessivement active et utile, — une cellule de combat.

Il était très important de savoir si le second vaccin était encore affaibli sous l'influence des humeurs vivantes du lapin. Les expériences suivantes furent faites à ce sujet.

On divisa en trois parties égales $0^{gr},15$ du 2e vaccin. $0^{gr},05$ furent inoculés à un lapin (A). Il se développa chez cet animal une tumeur absolument typique, qui pourtant disparut graduellement, et le lapin se rétablit complètement.

$0^{gr},05$ de vaccin furent enveloppés dans du papier à filtrer

et placés sous la peau d'un autre lapin (B). 24 heures après, on ouvrit la plaie et on incisa le papier, de manière à laisser le contenu s'échapper dans les tissus. Le lapin mourut, 48 heures après, du charbon symptomatique typique.

On introduisit 0gr,05 sous la peau d'un 3e lapin (C), de la même manière. 44 heures après l'introduction du sac, celui-ci fut rompu par la pression faite à travers la peau. Cet animal succomba 24 heures après au charbon symptomatique.

Afin de démontrer que ce résultat n'était aucunement dû à ce que le virus avait été introduit dans un endroit affaibli par la présence du papier à filtrer, l'expérience suivante fut entreprise.

On mit, sous la peau d'un lapin, un sac en papier renfermant 0gr,05 du 2e vaccin, c'est-à-dire une dose non mortelle ; 24 heures après, on retira le sac, et son contenu fut introduit sous la peau d'un lapin bien portant. Celui-ci succomba en moins de deux jours au charbon symptomatique.

Une dose de 0gr,0001 du 2e vaccin, dose qui, comme je m'en étais assuré antérieurement, donne au cobaye une maladie bénigne et non mortelle, fut enveloppée dans du papier à filtrer et placée sous la peau d'un lapin; 24 heures après on inocula le contenu du sac à un cobaye. Cet animal succomba au charbon symptomatique en moins de 48 heures.

On introduisit de la même manière 0gr,0005 du 2e vaccin sous la peau d'un lapin, et 24 heures après, on transporta la poudre inoculée sous la peau d'un cobaye : celui-ci succomba en moins de 24 heures.

Une autre objection qu'on pourrait faire à ces expériences est qu'en laissant le virus se développer pendant quelque temps dans l'organisme, et le transportant ensuite sur un second animal, j'injectais à celui-ci non seulement le virus primitif, mais encore les toxines déjà sécrétées dans l'intérieur des tissus, et que ces substances chimiques renforçaient l'effet du virus.

Je démontrerai amplement plus tard que ce n'est pas à cette cause qu'il faut attribuer la virulence plus grande du *bacillus Chauvæi*.

Revenons maintenant à la description des phénomènes observés chez les lapins inoculés avec le charbon symptomatique.

Nous avons vu qu'il était extrêmement difficile de trouver les bacilles au point d'inoculation, quand on n'avait introduit qu'une petite quantité de virus, 24 heures après l'opération ; d'un autre côté, la même quantité ($0^{gr},0005$) du 2e vaccin se développe parfaitement, pourvu qu'elle soit convenablement enveloppée dans du papier.

Au lieu d'examiner le point d'inoculation 24 heures après l'injection, examinons-le 3 ou 4 heures après.

On voit alors que beaucoup de bacilles se sont développés, mais que presque aussitôt ils ont été pour la plupart englobés par les leucocytes. Et, 24 heures après l'inoculation d'une petite quantité de virus, ils ont presque tous été détruits par les cellules migratrices.

Les phénomènes sont complètement différents si on injecte une quantité de virus suffisante pour produire une tumeur charbonneuse, sans nécessairement provoquer la mort de l'animal.

Comme chez le cobaye, il se forme au point d'inoculation une exsudation rouge sanguinolente qui contient de nombreux leucocytes remplis de bacilles. Après quelques jours, la paroi de l'abcès, souvent si bien limitée que l'on peut facilement la séparer des tissus environnants, est composée d'une quantité innombrable de leucocytes contenant des bacilles dans leur intérieur. Les bacilles diminuent graduellement de la paroi interne à la paroi externe, et finissent par disparaître complètement.

Mais quoique les bacilles soient limités au point d'inoculation, l'œdème occupe cependant une surface considérable. L'exsudation est d'un jaune pâle, sans être mélangée de sang, et s'étend le long des plans musculaires. Chez un lapin, inoculé au flanc, par exemple, l'exsudation séreuse peut s'étendre depuis le point d'inoculation jusqu'à la symphyse de la mâchoire inférieure, aux aisselles et aux muscles des jambes, et postérieurement jusqu'aux genoux et même plus bas. Une énorme quantité de liquide, jusqu'à 50 centimètres cubes, s'écoule après la mort. On n'observe pas de *crépitation* dans la tumeur, et l'examen du liquide exsudatif démontre qu'il ne contient point ou extrêmement peu de bacilles.

Les phénomènes sont très différents chez les lapins comme chez les cobayes, si on inocule un virus renforcé par un séjour sous la peau d'un autre animal. Les muscles au point d'inocu-

lation sont alors d'un rouge pourpre, flasques et pulpeux. Cet état des muscles s'étend à une certaine distance autour du point d'inoculation, mais jamais on ne voit une quantité d'exsudat séreux aussi grande que dans la forme chronique que je viens de décrire.

On trouve bien quelques leucocytes au point d'inoculation, et quelques-uns d'entre eux peuvent contenir une petite quantité de bacilles, mais la phagocytose est bien moins marquée que dans les cas chroniques, et le nombre des bacilles au point d'inoculation est proportionnellement augmenté. De plus, il n'est pas rare de trouver de nombreux bacilles dans les muscles, la rate, le foie et, chez les cobayes, même dans le sang du cœur.

Comme nous allons le voir, on peut donner au lapin un charbon symptomatique qui le tue en moins de 24 heures. Dans ces cas si aigus, on ne trouve point du tout de leucocytes au point d'inoculation quoiqu'il y ait un exsudat rouge abondant, dans lequel le *bacillus Chauvæi* se cultive très bien.

Charrin[1] a avancé que, dans les maladies infectieuses, le virus qui les provoque s'atténue graduellement dans les humeurs des animaux qui guérissent de cette maladie, et a démontré qu'il en était ainsi pour la maladie pyocyanique. Pourtant, sans vouloir critiquer les belles expériences de ce savant, je ne crois pas que cela soit une règle générale et qu'il en soit ainsi pour la maladie produite par le *bacillus Chauvæi*. Les expériences suivantes le prouvent.

Lapin (A) inoculé avec $0^{gr},05$ du 2e vaccin. On lui introduit sous la peau un petit sac en papier contenant 0,001 du premier vaccin, qu'on place de manière à ce qu'il soit entouré par la poudre du 2e vaccin, inoculé antérieurement. Deux jours après, on sacrifie le lapin (A) par le chloroforme; sa température avait oscillé entre $38^{\circ},3$ et $39^{\circ},4$. Toute la paroi de l'abcès fut raclée et injectée en masse sous la peau d'un cobaye (*a*). Le sac fut soigneusement ouvert et une trace de son contenu placée sous la peau d'un autre cobaye (*b*). Le premier (*a*) des deux cobayes fut très malade, mais guérit finalement, tandis que le second (*b*) succomba au charbon symptomatique en moins de 48 heures.

1. Cité par Bouchard, *Essai d'une théorie de l'infection*. Berlin, 1890.

Un lapin blanc (B) fut inoculé de la même manière que le lapin (A), et l'expérience ne fut modifiée qu'en ce que le sac en papier stationna sous la peau pendant quatre jours. Le cobaye, inoculé avec la paroi de l'abcès, mourut en 2 jours, tandis que l'autre, inoculé avec une trace du contenu du sac, succomba 12 heures avant.

Un autre lapin (C) fut inoculé de même, et le sac en papier resta pendant 6 jours sous la peau. Un cobaye, inoculé avec la paroi de l'abcès, mourut après 5 jours, tandis que le contenu du sac en papier tua un cobaye en moins de 36 heures.

Une expérience, dans laquelle je voulais laisser plus de 6 jours le sac en papier sous la peau, n'aboutit pas, à cause de la rupture du sac; mais il est à noter que ce lapin succomba au charbon symptomatique. On voit en résumé qu'il n'y eut aucune atténuation du 1er vaccin, quoiqu'il ait été baigné pendant plusieurs jours dans les liquides de l'abcès charbonneux.

Il était important de savoir aussi si les humeurs vivantes des lapins, dont l'immunité avait été renforcée par une inoculation antérieure du virus, avaient un pouvoir bactéricide sur le *bacillus Chauvæi*. Dans ce but je choisis deux lapins qui avaient, un mois avant, résisté à l'inoculation de 0gr,05 du 1er vaccin. On introduisit sous la peau d'un premier lapin un sac en papier contenant 0gr,01 du 2e vaccin, qu'on y laissa pendant 24 heures. Une trace de son contenu, inoculée à un cobaye, le tua en moins de 24 heures. Un autre sac en papier contenant la même dose du second vaccin fut inoculé à l'autre lapin et laissé sous la peau pendant 48 heures. Une minime quantité de son contenu tua un cobaye en moins de 36 heures.

Il a été démontré dans cet article, ainsi que dans un précédent sur le même sujet, que dans le charbon symptomatique les leucocytes se rassemblent au point d'inoculation, dès que les bacilles commencent à se développer.

Dans mon premier article, je n'ai pas donné l'explication de ce fait, quoique je me fusse efforcé d'élucider cette question; mais depuis les admirables recherches de Leber, Massart et Bordet, Gabritchevsky et Buchner, ont démontré que les poisons chimiques, sécrétés par les microbes, attirent les leucocytes à l'endroit de l'inoculation.

Je puis confirmer ces recherches quant au poison du charbon symptomatique, quoique mon mode d'expérimentation fût un peu différent de ceux qui ont été déjà usités.

Les humeurs contenues dans les muscles environnant le point d'inoculation d'un lapin mort du charbon symptomatique furent filtrées sur un filtre Chamberland. Une éponge stérilisée fut baignée dans ce liquide filtré et fut placée, avec un morceau d'une autre éponge pure et stérilisée, sous la peau d'un lapin. Les deux éponges furent retirées et examinées après trois heures.

Il fut alors constaté que le morceau d'éponge pure ne contenait presque pas de leucocytes, tandis que celui imprégné par l'humeur filtrée en contenait une quantité innombrable.

Dans quelques maladies, au moins dans les maladies mortelles, les leucocytes perdent leur pouvoir d'émigrer pour se rendre au point irrité. De plus, M. Bouchard[1] a montré que certaines sécrétions microbiennes injectées à un animal, supprimaient la diapédèse. Les expériences suivantes confirment les expériences de M. Bouchard.

On sait que l'inoculation du bacille pyocyanique provoque une émigration de leucocytes au point d'inoculation. De plus, Charrin[2] a prouvé que si l'on introduit 0,25^{cc} d'une culture fraîche et virulente du bacille pyocyanique dans une veine d'un lapin, cet animal succombe en 24 heures à une affection aiguë. A l'autopsie, on trouve le bacille pyocyanique dans tous les organes, le foie, la rate, les poumons, etc.; mais les microbes sont libres dans les humeurs, ils ne sont pas englobés par les cellules. L'expérience suivante montre que chez un animal atteint de la maladie pyocyanique les leucocytes sont incapables de sortir des vaisseaux pour attaquer le bacille.

Un lapin fort et bien portant (A) fut inoculé dans la veine marginale de l'oreille avec 0,1^{cc} d'une culture de bacille pyocyanique. 5 heures après, à 5 heures du soir, on inocula à cet animal, ainsi qu'à un autre lapin (B) de la même dimension, une goutte d'une culture du bacille pyocyanique dans la

1. Bouchard, *loc. cit.* Page 11.
2. Charrin, *la Maladie pyocianique.*

chambre antérieure de l'œil. Dans les deux cas, l'iris fut légèrement lésé, et une petite quantité de l'humeur inoculée s'échappa au moment où l'on retirait l'aiguille.

Le lendemain, à 2 heures, le premier lapin était mourant. L'examen de l'œil inoculé démontra une faible inflammation de l'iris, strictement limitée au point où l'aiguille l'avait lésé. La cornée n'était que légèrement opaque, et le liquide de la chambre antérieure contenait une culture pure du bacille pyocyanique, ainsi qu'une très petite quantité de leucocytes. Il n'y avait pas de conjonctivite. L'état de l'œil de l'autre animal était très différent. On y voyait tous les symptômes classiques d'une iritis intense : la cornée était opaque, la chambre antérieure était remplie de leucocytes émigrés dont beaucoup contenaient une quantité de bacilles, et la conjonctive était visiblement congestionnée. L'animal avait l'air tout à fait bien portant, était vif et ne semblait pas souffrir. Il fut sacrifié par le chloroforme.

On ne trouva de bacilles dans aucun de ses organes; les humeurs du foie, du poumon, du cœur, des reins, etc., ensemencées sur gélatine, ne donnèrent pas de cultures.

M. Charrin a démontré qu'une culture du bacille pyocyanique, injectée sous la peau d'un lapin, provoque une forme plus lente de la maladie, qui peut durer 4 à 5 jours. J'injectai 2 centimètres cubes de culture du bacille pyocyanique sous la peau à la base de l'oreille d'un lapin, et, 6 heures après, j'inoculai, ainsi qu'à un témoin, une goutte de la même culture dans la chambre antérieure. Tandis que chez le témoin il survint aussitôt une inflammation de l'œil, celle-ci fut ajournée chez l'autre lapin. L'exsudation leucocytaire n'était que peu marquée le second jour : elle augmenta légèrement pendant le troisième et le quatrième, et ce n'est que dans la septième journée qu'elle s'éleva au même degré d'intensité que chez le témoin.

Après cette expérience, je voulus naturellement voir si l'inflammation produite par le bacille pyocyanique était retardée ou supprimée dans le cas où l'animal avait une maladie infectieuse pendant laquelle les leucocytes sont inactifs, comme le charbon par exemple. Je pus m'assurer que les leucocytes du cobaye ou du lapin, qui ne sont pas en état d'englober une seule bactéridie charbonneuse, émigraient librement et englobaient

de nombreux bacilles pyocyaniques quand on injectait sous la peau d'un animal charbonneux une culture de ce microbe. Je reviendrai sur ce fait important en terminant mon article.

Étudions maintenant ce qui arrive quand on entrave l'émigration leucocytaire chez un animal inoculé avec le charbon symptomatique. M. Arloing a démontré le premier que le charbon symptomatique ayant perdu sa virulence, peut être renforcé par l'addition d'acide lactique, et attribue ce phénomène à l'action directe de l'acide sur le virus. MM. Roux et Nocard[1], qui répétèrent cette expérience, expliquèrent le fait par l'action directe de l'acide sur les tissus.

Dernièrement, MM. Vaillard et Vincent[2] ont avancé que, chez les animaux inoculés du tétanos, l'acide lactique augmentait la virulence du microbe de Nicolaïer, et MM. Massart et Bordet[3] ont prouvé que cet acide a une propriété négativement chimiotaxique.

Je suis arrivé aux mêmes conclusions que ces savants mais par une autre voie. J'introduisais deux petites pelotes de coton sous la peau d'un cobaye; mais, tandis que l'une d'elles était stérile, l'autre avait été plongée pendant 2 heures dans une solution d'acide lactique au dixième. Les pelotes furent retirées après 6 heures, leur contenu étalé sur des lamelles qui furent séchées soigneusement et colorées par le bleu de Loeffler. Le résultat obtenu fut très intéressant : car tandis que la pelote normale contenait des leucocytes, l'autre, qui avait été plongée dans l'acide lactique, n'en contenait absolument pas.

Depuis cette expérience, j'ai examiné une série de corps qui possèdent tous la chimiotaxie négative. Je citerai l'iode, le sublimé, l'acide phénique, la térébenthine, le xylol.

Il restait encore à prouver que l'action de l'acide lactique est la même si on injecte le charbon symptomatique en même temps.

On introduisit deux petits sacs en papier ouverts à une extrémité et contenant chacun $0^{gr},005$ du 1er vaccin du charbon symptomatique; mais tandis que l'un (A) ne contenait pas d'acide lactique, l'autre (B) avait été plongé, ainsi que la poudre,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, p. 257.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1891.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1891.

pendant une heure, dans une solution d'acide lactique au dixième. Le sac (A) fut introduit dans le flanc droit; le sac (B), contenant le virus imprégné d'acide lactique, dans le flanc gauche. 24 heures après, on put facilement observer une petite tumeur du côté gauche, tandis que le flanc droit paraissait normal. On sacrifia alors l'animal par le chloroforme, et les tissus environnant le point d'inoculation furent examinés sur des préparations étalées et sur des coupes.

Autour du sac A, il y avait de nombreux leucocytes, dont beaucoup contenaient des bacilles ainsi qu'un assez grand nombre de bacilles libres. Les muscles environnants étaient presque normaux et il n'y avait pas d'œdème notable.

Du côté opposé, le liquide entourant directement le sac ne contenait que très peu de leucocytes dont la majorité était vide, et dans le sac même il n'y avait que très peu de leucocytes qui ne contenaient pas de bacilles. Les muscles environnants étaient enflés, mous, gélatineux et laissaient échapper une grande quantité d'un liquide où fourmillaient des bacilles libres, mais très peu de leucocytes. Les muscles du flanc gauche avaient cet aspect sur toute l'étendue limitée par la ligne médiane, l'aine et l'épaule, et contenaient des bacilles innombrables.

J'ai montré que les toxines sécrétées par les bacilles de Chauveau avaient une propriété chimiotaxique positive. D'autre part, M. Roger a prouvé que si les toxines du *bacillus Chauvei* étaient injectées dans les veines en même temps que le virus était introduit sous la peau, la maladie se terminait par la mort, même chez les lapins réfractaires.

Les résultats de M. Roger sont parfaitement exacts, mais il ne faut pourtant pas en conclure que les leucocytes soient paralysés par les toxines injectées dans les veines.

En premier lieu, les toxines contenues dans le liquide près du point d'inoculation, loin de paralyser les leucocytes, exercent une action stimulante sur ces cellules. — De plus, les expériences suivantes prouvent que les toxines, sécrétées par le bacille de Chauveau, et introduites dans les veines, ne paralysent nullement les leucocytes.

Un lapin fut inoculé dans le flanc avec 10 gouttes du liquide exsudatif pris au point d'inoculation d'un cobaye, mort après

avoir été inoculé avec le *bacillus Chauvei*. L'inoculation simultanée des toxines et des bacilles n'avait aucunement paralysé les leucocytes, car l'animal ne mourut pas.

Un autre lapin fut inoculé dans les veines avec 10 gouttes du même liquide, sans aucun résultat apparent. Ici aussi il paraît ne pas y avoir eu de paralysie des leucocytes, quoique les bacilles et les toxines aient été injectés en même temps.

Un troisième lapin fut inoculé avec 5 gouttes du même liquide dans les muscles de la jambe droite, et 5 gouttes dans les veines. 15 heures après, cet animal fut trouvé mort avec une énorme tumeur au point d'inoculation du virus. Ce point, soigneusement excisé et durci, ainsi que la rate, le foie, les reins, les poumons et le cœur, furent examinés sur des coupes colorées par le carmin et la méthode de Gram.

On trouva alors qu'au point d'inoculation les fibres musculaires étaient séparées par le liquide exsudatif, contenant par endroits une quantité énorme de bacilles, *mais pas un seul leucocyte*.

Le cœur, les reins et les poumons ne contenaient pas de bacilles. Dans la rate on en trouvait quelques-uns, tous dans de grands macrophages, et en voie de dégénérescence. Les cellules hépatiques n'en contenaient pas, mais les grands macrophages qui sont toujours présents dans les vaisseaux du foie et les microphages renfermaient souvent un grand nombre de bacilles. Nulle part je ne parvins à trouver des bacilles libres dans le sang.

Il ressort clairement de ces expériences que quoique les leucocytes ne fussent nullement paralysés, puisqu'ils absorbaient les bacilles contenus dans les vaisseaux, ils ne traversaient pas les parois vasculaires pour détruire les bacilles qui se trouvaient dans le tissu sous-cutané.

A quoi attribuer cette inactivité des leucocytes? J'avais d'abord pensé, guidé en cela par les belles recherches de MM. Charrin et Gley[1], à des modifications vasculaires, mais je dus bientôt me convaincre que les leucocytes, quoique se refusant d'émigrer pour combattre les bacilles au dehors des vaisseaux, sortaient promptement s'ils avaient un autre objet

1. *Archives de physiologie*, octobre 1890.

d'attraction. En répétant la dernière expérience et en inoculant en même temps le bacille pyocyanique dans l'oreille, je trouvais, 6 heures après, le point d'inoculation du bacille pyocyanique envahi par les leucocytes. Ces cellules amiboïdes émigrées étaient extrêmement actives et voraces, tandis qu'on n'en voyait point du tout au point d'inoculation du bacille du charbon symptomatique.

Dans mon premier article j'avais émis l'opinion que de ce que les humeurs mortes d'un animal étaient bactéricides, il n'en fallait pas conclure qu'il en était de même pour les humeurs vivantes. J'aurais alors pu ajouter que le sang mort d'un animal a une influence extrêmement toxique pour l'animal même duquel il a été retiré.

Dans une leçon remarquable faite à l'Institution Royale de Londres le professeur Klein [1] a fait une étude critique de toute la question des phagocytes, et attribue l'immunité de certains animaux contre certaines maladies infectieuses à l'action bactéricide des humeurs.

Après avoir cité la description que Metchnikoff a donnée de la destruction des bacilles du charbon par les leucocytes quand le virus est introduit dans la cavité lymphatique de la grenouille, le docteur Klein poursuit ainsi : « Il paraît très étrange de chercher là une explication suffisante de l'état réfractaire de la grenouille envers le charbon, car il faut considérer que les bacilles, comme les autres corps minuscules, injectés dans le sac lymphatique, doivent être absorbés et entraînés dans la circulation sanguine en quelques minutes, même en quelques secondes, dans tous les cas des heures avant que les phagocytes aient eu le temps de se rassembler en quantité suffisante dans le sac lymphatique pour engager une lutte avec les bacilles. »

Cet argument ne me semble pas avoir le poids que M. Klein semble lui attribuer. En premier lieu, quand on examine l'humeur du sac lymphatique de la grenouille on y trouve toujours de nombreux phagocytes.

Secondement, quand on injecte dans le sac lymphatique d'une grenouille des poudres fines, de vermillon par exemple,

1. *Nature*, avril 1891.

de charbon ou de tournesol, les particules sont absorbées par l'intermédiaire des leucocytes, mais nullement avec rapidité. En injectant par exemple une goutte de solution saline, contenant du tournesol finement pulvérisé, dans le sac lymphatique de la grenouille, je retrouvais facilement la poudre le lendemain. Une partie en était contenue dans les leucocytes et une autre était libre entre les cellules. On trouve donc dans le sac lymphatique de la grenouille des leucocytes prêts pour la lutte. De plus les particules solides ne sont pas absorbées aussi rapidement que le suppose M. Klein.

Plus loin on lit le passage suivant : « Il a été abondamment prouvé que dans certains cas les bacilles entrent réellement dans la circulation sanguine, mais qu'ils y sont détruits non pas par les leucocytes, mais par la partie liquide du sang, le plasma; il a aussi été prouvé que les parties liquides du sang et de la lymphe en général ont une action bactéricide très marquée, indépendamment des éléments cellulaires, leucocytes ou autres cellules. »

Le Dr Klein ne fait aucune différence entre l'action du sérum vivant et celle du sérum mort, et comme il ne cite pas les faits sur lesquels il base ses conclusions, je ne puis les discuter. Mais il me semble pourtant que tous les travaux faits sur ce sujet pendant ces dernières années, mettent hors de doute l'action des éléments cellulaires du sang.

D'après M. Klein, on peut donner l'explication suivante des faits avancés par Metchnikoff : « Les bacilles ne peuvent exister dans le liquide lymphatique et sanguin ; ils y sont détruits, mais ils se réfugient dans les leucocytes et les cellules lymphatiques où ils peuvent vivre. » Mais après un certain temps, « la substance des cellules lymphatiques suspendues dans la lymphe ou le plasma sanguin s'imprègne de la substance bactéricide des humeurs et alors les microbes meurent bientôt, même dans les cellules ». Et pour corroborer son point de vue, M. Klein continue : « L'action bactéricide du sang d'un animal envers une maladie donnée est grande quand l'animal est réfractaire pour le microbe pathogène qui la produit, mais elle est faible si l'animal n'est pas réfractaire à ce microbe. »

On peut pourtant objecter à ceci, que Metchnikoff a vu que les humeurs vivantes des pigeons, des rats et des chiens, animaux plus ou moins réfractaires envers le charbon, étaient

d'excellents milieux de culture pour la bactéridie charbonneuse. On peut dire aussi d'autre part que le sang mort des animaux qui ne sont point réfractaires pour un microbe donné, est souvent un mauvais milieu de culture pour ce dernier, comme l'ont démontré les travaux de MM. Charrin et Roger. La dernière partie de l'objection de M. Klein doit être basée sur une interprétation erronée des faits.

Néanmoins la première partie de ses arguments demande à être soigneusement discutée.

M. Klein admet que les bacilles périssent au dedans des leucocytes, mais il croit que la substance bactéricide, dont il admet la présence dans le sang et la lymphe, pénètre dans les leucocytes et exerce alors son effet curatif.

Pourtant il n'est nullement prouvé que les leucocytes se laissent pénétrer par toutes les substances chimiques qui les entourent.

On sait que si l'on injecte dans la circulation des particules solides comme le carmin, le vermillon ou une autre poudre quelconque, certaines cellules englobent la poudre jusqu'à éclater tandis que d'autres refusent d'y toucher. De même il a été nettement établi que les cellules des reins, du foie, des intestins, etc. absorbent certaines substances chimiques, tandis qu'elles en rejettent d'autres. L'expérience suivante prouve que certaines cellules amiboïdes, celles de la rate, par exemple, ont un pouvoir de sélection analogue. On injecta dans la veine latérale de l'oreille d'un lapin vivant une solution saturée de sulfindigotate de soude, jusqu'à ce que toutes les muqueuses fussent colorées en bleu foncé. Cette injection ne nuisit nullement à la santé de l'animal, ce sel n'ayant aucun effet toxique. 4 heures après on sacrifia l'animal par le chloroforme.

A l'autopsie le foie et les reins étaient d'un bleu foncé. L'intestin, au-dessous de l'ouverture du conduit biliaire, contenait une grande quantité de sel de soude, mais la rate était parfaitement normale. Des morceaux de poumon, de foie, de rein et de rate furent placés dans de l'alcool absolu, qu'on changea une heure après et le lendemain. A l'examen des coupes on trouva le sel bleu dans les cellules épithéliales des reins et du foie, mais on n'en trouva pas trace dans les leucocytes de la rate, du foie et du poumon. On voit donc que les leucocytes ne laissent

pas pénétrer toutes les substances chimiques qui les entourent.

Mais en admettant même que c'est la lymphe qui agit dans les leucocytes, M. Klein n'explique pas pourquoi on ne trouve de bacilles dégénérés que dans les leucocytes.

Voyons en effet ce qui se passe dans les cas où la phagocytose et l'exsudation sont bien marquées : quand, par exemple, on inocule le bacille de Chauveau à un cobaye. On observe assez souvent des signes de dégénérescence au point d'inoculation, mais les microbes dégénérés sont dans les leucocytes exclusivement. Dans le charbon, la diphtérie, la tuberculose, partout les bacilles présentant des signes de dégénérescence sont englobés dans les cellules et non pas libres. Si par conséquent la théorie du Dr Klein est juste, nous devrions conclure que les substances bactéricides, quoique présentes dans les humeurs, n'agissent qu'à l'intérieur des cellules.

Un peu plus loin, M. Klein dit que les cellules paraissent posséder une attraction chimique particulière pour les bactéries. On avait accepté jusqu'ici que ce sont, au contraire, les bactéries qui attirent les cellules, et on avait expliqué ainsi pourquoi des milliers de leucocytes émigraient aux points où étaient rassemblés les microbes. Il faut convenir que ce fait devient inexplicable si, comme le maintient M. Klein, ce sont les cellules qui attirent les bactéries.

Je laisse pour le moment de côté d'autres arguments de M. Klein qui sont en rapport moins immédiats avec le sujet de cet article. Ce qui précède suffit à juger la doctrine de ce savant d'après laquelle les leucocytes ne jouent aucun rôle dans la destruction des microbes.

Je reviens maintenant, pour les résumer, aux résultats de mes expériences.

Nous avons vu, chez les cobayes comme chez les lapins, que les bacilles du charbon symptomatique se développent aussitôt qu'ils sont introduits dans l'organisme, et que les leucocytes se rassemblent à l'endroit où se trouve le virus. De plus les leucocytes sont attirés par le poison chimique sécrété par les microbes, et, une fois émigrés, ils attaquent vivement ces derniers, les englobent et les détruisent. Il faut remarquer que l'émigration cellulaire, au point d'inoculation, varie inversement à la quantité

et à la force du virus introduit, mais est proportionnelle à la longueur et à la bénignité de la maladie. L'émigration des leucocytes est faible ou nulle quand on inocule une grande quantité de bacilles extrêmement virulents, devient plus marquée quand les bacilles inoculés sont peu nombreux ou qu'ils ont été affaiblis antérieurement.

En outre, si les leucocytes sont empêchés par une cause quelconque, mécanique ou chimique, d'aborder le virus, la maladie fait aussitôt des progrès et l'animal succombe. Cela est démontré par l'expérience où, après avoir laissé le virus sous la peau dans une enveloppe de papier à filtrer, on retire ou on rompt ce papier protecteur. De même quand les leucocytes sont arrêtés par l'acide lactique d'un côté du corps, la maladie ne se développe que de ce côté-là. De plus, les humeurs vivantes de l'animal naturellement réfractaire ou de l'animal dont l'immunité a été renforcée par une inoculation antérieure, n'a aucune action bactéricide sur le virus du charbon symptomatique, puisque ce même virus baigné dans ses humeurs, retiré et ensuite injecté à un animal réfractaire, lui donne la mort. Enfin les humeurs de l'animal malade ne paraissent pas avoir une action atténuante ou bactéricide sur le microbe de la même maladie.

Ce que je viens de dire au sujet de l'émigration cellulaire ne peut être en aucune façon appliqué à l'exsudation, autre phénomène qui accompagne l'inflammation. On serait plutôt porté à croire que les deux processus sont en relations inverses. Comparons par exemple l'exsudation sanguine d'un lapin, succombant en 12 heures à l'inoculation du bacille de Chauveau, et la substance épaisse, compacte, presque solide, qui s'accumule autour du virus inoculé à un animal réfractaire.

N'est-il pas évident que, dans cette maladie du moins, l'exsudation séreuse est toujours plus abondante quand la maladie est plus virulente? Mais, malgré la quantité énorme de cette exsudation, les microbes ne paraissent nullement en être nuisiblement affectés. Au contraire, ils y pullulent et acquièrent une virulence extraordinaire.

Un autre résultat très évident est que si les substances produites par les microbes ont déjà pénétré dans le sang, les poisons, sécrétés par le même microbe inoculé dans d'autres parties du corps de l'animal, n'attirent point les leucocytes. Les

résultats que j'ai obtenus avec le bacille pyocyanique en sont un exemple. Si l'on injecte une goutte de culture dans l'œil du lapin, les leucocytes émigrent en grande quantité au point d'injection. Mais si le poison, produit par le bacille pyocyanique, circule d'avance dans le sang, les leucocytes n'émigrent point, et l'œil reste intact. Il en est de même quand on injecte le charbon symptomatique simultanément dans les veines et sous la peau. Ce sont là des faits confirmant exactement les expériences de M. Bouchard [1] et de M. Roger.

Dans le cas du bacille pyocyanique, il y a des raisons pour croire que les leucocytes sont réellement paralysés : ainsi MM. Charrin et Gamaléia [2] ont démontré que, si l'on applique de l'huile de croton à l'oreille d'un lapin intoxiqué par les produits du bacille pyocyanique, on n'obtient point de réaction inflammatoire au point où l'huile de croton a été appliquée.

Cette explication n'est pourtant pas applicable aux résultats obtenus avec le bacille de Chauveau. Dans ce cas, les leucocytes sont très actifs dans les vaisseaux sanguins et la rate, mais complètement incapables d'émigrer dans les tissus environnants pour y attaquer les bacilles de la même espèce. Ils ne sont pourtant pas paralysés, car ils quittent les vaisseaux pour attaquer un autre bacille, notamment le bacille pyocyanique. C'est ainsi que les leucocytes d'un animal charbonneux refusent d'englober la bactéridie, tandis qu'ils avalent très bien tout autre microbe.

Il ne peut être question non plus d'un trouble vaso-dilatateur comme dans les expériences classiques de MM. Charrin et Gley. Du reste je me plais à reconnaître que les expériences de ces savants sont parfaitement exactes, comme je viens de m'en assurer par moi-même.

Pour conclure, je dois avouer que les faits que je viens d'énumérer me semblent confirmer la théorie que MM. Massart et Bordet ont énoncée dans ces *Annales* [3]. Pourtant, il me semble qu'avant d'accepter la théorie de ces savants, il faut étudier l'action sur l'inflammation de certaines substances chimiques bien

1. Bouchard, *loco citato*, p. 12 et 13.
2. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 2 juin 1890.
3. *Institut Pasteur*, 1891, p. 441.

définies, injectées en même temps sous la peau et dans les veines. Ce sera là l'objet d'un prochain travail.

La plus grande partie de ce travail a été exécutée dans les laboratoires réunis des collèges royaux de Londres. Je m'empresse d'exprimer mes remerciements à M. le Dr G. Sims-Woodhead, directeur de ces laboratoires. Quoique je sois seul responsable des faits et des théories exposés dans ce travail, c'est avec plaisir que je reconnais la grande utilité de la critique judicieuse et des conseils de M. le Dr Woodhead.

SUR LES CAUSES DE L'ATTÉNUATION DES MOELLES RABIQUES

PAR M. E. VIALA.

(Travail du laboratoire de M. Roux à l'Institut Pasteur.)

Les expériences faites au laboratoire de M. Pasteur ont établi que si on inocule, par trépanation, le virus rabique à une série de lapins, en se servant du bulbe de l'animal qui vient de mourir pour inoculer le lapin suivant, la durée de l'incubation de la rage est de plus en plus courte. Après un grand nombre de passages, elle est exactement de six jours, et alors elle ne diminue plus. Le virus rabique qui a acquis cette virulence maximum pour le lapin est désigné sous le nom de virus fixe, il sert à préparer le *vaccin de la rage* pour les inoculations antirabiques inventées par M. Pasteur.

Pour transformer en vaccin ce virus fixe, on suspend les moelles rabiques de passage dans un flacon à tubulure inférieure, contenant de la potasse et maintenu à la température de 23°. Dans ces conditions, la moelle perd sa virulence; d'ordinaire, après 5 ou 6 jours, elle ne donne plus la rage aux animaux, même si on les inocule sous la dure-mère. Cette observation a été le point de départ de la méthode de prévention de la rage après morsure.

Quelle est la cause de cette perte de virulence dans les moelles conservées à l'air sec? M. Pasteur[1] l'a attribuée à l'action de l'oxygène de l'air et de la chaleur. Il a montré que si la moelle rabique est placée, à l'état humide, dans le gaz acide carbonique, à la température ordinaire, la virulence se conserve pendant plusieurs mois, pourvu qu'aucun microbe étranger ne se développe dans la substance nerveuse.

Depuis la communication de M. Pasteur, plusieurs expérimentateurs ont étudié l'action de la lumière, de la chaleur et

1. *Comptes rendus Acad. des Sc.*, 26 oct. 1885.

de différents agents chimiques sur les moelles rabiques. MM. Celli, de Blasi, Travali, Babès, Hogyes, Zagari ont publié divers travaux à ce sujet. M. Protopopoff [1] a constaté que les moelles rabiques immergées dans le bouillon glycériné s'affaiblissent comme celles conservées à l'air, et il pense que c'est la chaleur qui produit l'atténuation. Dans un travail [2] très soigné « sur le mécanisme de l'atténuation du virus rubique, » M. Zagari a étudié l'action de l'air, du vide pneumatique, de l'acide carbonique, de la sécheresse et de la température. L'auteur opérait sur des morceaux de moelle suspendus dans des éprouvettes renfermant tantôt de la potasse, tantôt n'en contenant pas, et sur des moelles immergées dans l'eau stérilisée ou dans un bouillon mélangé de glycérine à parties égales. Les expériences étaient faites à 20° et à 35°. Après avoir constaté, toutes choses égales d'ailleurs, que l'atténuation se fait beaucoup plus vite à cette dernière température, il a fait la majeure partie de ces essais à 35°. Ainsi il remarque qu'à cette température les moelles humides perdent leur virulence après 56 heures dans l'air, et la conservent après 121 heures dans le vide et après 198 heures dans l'acide carbonique. Les moelles sèches perdent leur virulence après 66 heures dans l'air, et la conservent après 116 heures dans le vide. Ces résultats, confirmés par ceux obtenus avec les moelles conservées dans l'eau et le bouillon montrent qu'à cette température de 35° l'air joue un rôle important dans l'atténuation. Mais dans la pratique les moelles rabiques sont conservées à 23°, et on ne peut pas étendre les conclusions des expériences faites à 35° à celles qui se passent à des températures plus basses.

Un autre travail étendu sur ce sujet est celui de M. A. Bruschettini [3], qui a examiné la façon dont se comporte le virus rabique dans le vide et dans plusieurs gaz. M. Bruschettini prépare des émulsions de moelle rabique de passage au moyen d'un liquide formé de parties égales de glycérine neutre et de bouillon peptonisé stérilisé. Ces émulsions sont conservées les unes dans le vide, les autres sont gardées dans des atmosphères d'hydrogène, d'azote et d'acide carbonique, après que ces gaz ont

1. Tous ces travaux ont paru ou ont été résumés dans ces *Annales*.
2. *Giorn. intern. delle Sc. Mediche* (12e année, 1890).
3. *Annales de micrographie*, 20 octobre 1899.

barbotté dans leur intérieur. Après des temps variables, la virulence de ces émulsions est essayée par comparaison avec celle d'une émulsion restée dans un tube simplement fermé par un tampon de coton. Ces essais ont été faits à l'abri de la lumière et à des températures qui ont varié de 13° à 35°. Les résultats du travail de M. Bruschettini sont résumés dans les cinq conclusions suivantes :

1° Dans l'hydrogène, l'azote et le vide, le virus rabique conserve son pouvoir pathogène pendant un temps relativement long.

2° Dans l'acide carbonique, ce virus est tout à fait détruit après treize jours.

3° L'extinction du pouvoir pathogène sous l'influence de l'acide carbonique n'est pas due à l'atténuation, mais à la destruction de ce virus.

4° Dans l'hydrogène, le virus rabique conserve sa virulence, même à une température de 35°, pendant cinq jours.

5° En général, la température est la cause principale de l'atténuation du virus de la rage.

Dans ses expériences, M. Bruschettini a mis le virus rabique dans des conditions bien différentes de celles où il est placé dans la préparation des vaccins antirabiques. Il opère sur de fines émulsions de moelle dans un milieu glycériné peptonisé, au lieu de laisser la moelle exposée par fragments à l'action des divers agents. De plus, il ne tient pas compte de l'influence de la dessiccation qui se produit dès les premiers jours lorsqu'on prépare les moelles par le procédé de M. Pasteur. Les conclusions de M. Bruschettini ne s'appliquent donc pas rigoureusement à l'atténuation des moelles qui servent aux inoculations antirabiques.

Dans le travail que je vais exposer, je me suis efforcé de mettre en évidence l'influence de l'action de l'air, de la chaleur, de la dessiccation dans l'atténuation des moelles rabiques, *telles qu'on les prépare pour la pratique des inoculations préventives.* Une des plus grandes difficultés de ces expériences, c'est la conservation des moelles humides à l'état de pureté, pendant des temps très longs. Il faut enlever la moelle avec beaucoup de soin et de précautions pour éviter qu'elle ne soit souillée par les germes de l'air. Pour étudier la virulence des moelles, surtout quand on arrive à la limite des expériences, il faut en inoculer d'aussi fortes proportions que possible, afin de ne pas regarder

comme inactives les moelles qui contiennent encore des parcelles virulentes.

Afin que les résultats soient plus comparables, les fragments de moelle soumis aux diverses influences étaient aussi semblables que possible et provenaient du même animal.

I

MOELLES CONSERVÉES HUMIDES DANS LE VIDE, L'ACIDE CARBONIQUE, L'HYDROGÈNE, L'AIR ET A L'OBSCURITÉ.

A. *Moelles conservées dans le vide.* — Pour ces expériences, j'emploie un ballon (A, fig. 1), sur le col duquel est soudée une

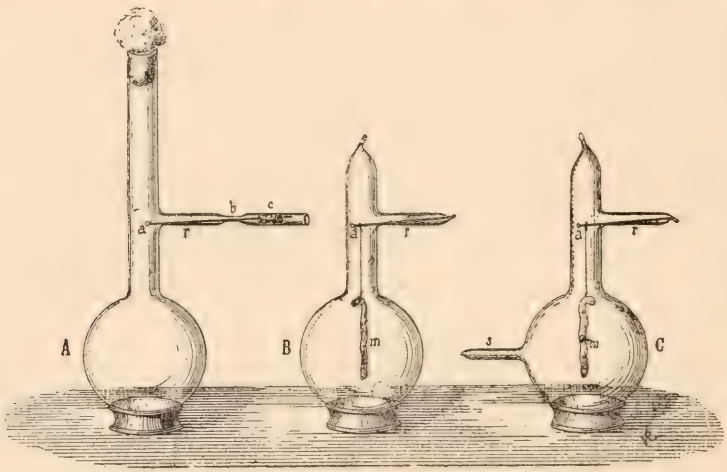


Fig. 1.

tubulure latérale renfermant intérieurement un tampon de coton *a* et une fine tige de verre, dont l'extrémité *c* arrive dans le col du ballon, qui porte un tampon de coton à sa partie supérieure. L'appareil a été stérilisé dans le poêle à flamber, à la façon ordinaire. Je retire le coton de la partie supérieure du col, je fais descendre la moelle rabique suspendue par un fil portant une boucle à la hauteur convenable. Lorsque celle-ci est dans l'axe de la tubulure latérale, je pousse un peu la petite tige de verre, qui s'engage dans la boucle du fil et maintient la moelle suspendue au centre du ballon.

TABLEAU I

DURÉE DE SÉJOUR DES MOELLES		DURÉE D'INCUBATION	
		LAPIN	COBAYE
Entre —4° et +4°.	15 jours.	8 jours.	8 jours.
	1 mois.	8 —	8 —
	2 —	A résisté.	A résisté.
	3 —	A résisté.	A résisté.
	4 —	12 jours.	8 jours.
	5 —	11 —	—
A 23°.	2 jours.	7 jours.	8 jours.
	4 —	9 —	9 —
	6 —	8 —	A résisté.
	8 —	8 —	8 jours.
	15 —	10 —	10 —
	20 —	8 —	8 —
	21 —	9 —	11 —
	22 —	12 —	13 —
	23 —	A résisté.	16 —
	24 —	12 jours.	12 —
	25 —	A résisté.	A résisté.
	26 —	11 jours.	11 jours.
	27 —	A résisté.	9 —
	28 —	8 jours.	12 —
	29 —	A résisté.	11 —
	30 —	—	A résisté.
	31 —	—	—
	32 —	—	—
	33 —	—	48 jours.
	34 —	—	A résisté.
	35 —	—	—
A 35°.	2 jours.	10 jours.	8 jours.
	3 —	9 —	A résisté.
	4 —	8 —	9 jours.
	5 —	9 —	11 —
	6 —	11 —	15 —
	7 —	10 —	11 —
	8 —	8 —	10 —
	9 —	9 —	9 —
	10 —	12 —	13 —
	11 —	14 —	12 —
	12 —	A résisté.	A résisté.
	13 —	11 jours.	11 jours.
	14 —	13 —	14 —
	15 —	11 —	A résisté.
	16 —	A résisté.	—
	17 —	—	—
	18 —	10 jours.	10 jours.
	19 —	A résisté.	12 —
	20 —	—	A résisté.
	21 —	—	—
	22 —	12 jours.	8 jours.
	23 —	A résisté.	A résisté.

La partie supérieure du col est ensuite effilée et fermée à la lampe. Par la tubulure latérale, je fais le vide à l'aide d'une trompe à eau, à trois reprises différentes, en faisant rentrer à chaque fois de l'hydrogène, pour enlever les dernières traces d'air; et lorsque le vide est fait pour la troisième fois, je ferme à la lampe (B, fig. 1).

On obtient ainsi un vase clos qui contient la moelle rabique suspendue dans le vide, et qu'on peut laisser le temps voulu à la température à laquelle doit être faite l'expérience sans qu'elle se dessèche. La conservation se fait toujours dans une chambre obscure.

J'ai d'abord étudié la durée de conservation du virus rabique, provenant d'une moelle de 270e passage, et gardé à trois températures différentes : 1° au froid, c'est-à-dire à une température qui a varié de — 4° à + 4°; 2° à 23°; 3° à 35°.

A divers intervalles je prélevais un des ballons, et j'inoculais la moelle qu'il contenait à un lapin par trépanation, et à un cobaye dans l'œil. Le tableau ci-dessus résume mes expériences et leurs résultats. Pour chacune des moelles est indiquée la durée d'incubation de la rage qu'elle a produite sur le lapin et le cobaye.

On voit, d'après ce tableau, que :

1° La durée de conservation du virus rabique dans le vide et au froid dépasse 5 mois. Je n'ai pas pu prolonger l'expérience au delà, ma provision de moelle étant épuisée.

2° La virulence à 23° se conserve moins longtemps et a disparu du 28e au 33e jour.

3° La durée de conservation est encore moins considérable à 35°, où elle n'est guère que de 20 à 22 jours. Les quelques irrégularités qu'on remarque dans les tableaux d'expériences sont inévitables, à cause de l'inégale distribution du virus dans la moelle rabique.

B. *Moelles conservées dans l'acide carbonique.*

Les mêmes expériences ont été répétées en maintenant les moelles dans l'acide carbonique à la pression ordinaire.

Le dispositif expérimental était semblable à celui qui a été décrit ci-dessus ; le ballon présentait seulement en plus (fig. 1, C) une tubulure latérale renfermant un tampon de coton. La moelle était suspendue comme précédemment, et après avoir fermé à la

lampe le col du ballon, on faisait passer pendant 3/4 d'heure un courant continu de gaz carbonique par la tubulure inférieure. On fermait ensuite à la lampe les deux tubulures, du ballon et du col.

Voici le tableau qui résume mes expériences :

TABLEAU II

DURÉE DE SÉJOUR DES MOELLES		DURÉE D'INCUBATION	
		LAPIN	COBAYE
Entre —4° et +4°.	15 jours.	8 jours.	10 jours.
	1 mois.	8 —	A résisté.
	2 —	8 —	8 jours.
	3 —	74 —	A résisté.
	4 —	8 —	7 jours.
	5 —	8 —	7 —
A 23°.	21 jours.	11 —	11 —
	22 —	A résisté.	13 —
	23 —	11 jours.	11 —
	24 —	A résisté.	A résisté.
	25 —	9 jours.	9 jours.
	26 —	8 —	8 —
	27 —	10 —	10 —
	28 —	A résisté.	A résisté.
	29 —	14 jours.	14 jours.
	30 —	13 —	13 —
	31 —	A résisté.	A résisté.
	32 —	—	—
	33 —	—	—
	34 —	14 jours.	—
	35 —	A résisté.	—
	36 —	11 jours.	—
	37 —	A résisté.	—
	38 —	—	—
	39 —	—	—
A 35°.	10 —	8 jours.	7 jours.
	11 —	9 —	9 —
	12 —	12 —	13 —
	13 —	11 —	17 —
	14 —	25 —	29 —
	15 —	10 —	6 —
	16 —	14 —	18 —
	17 —	20 —	A résisté.
	18 —	15 —	11 jours.
	19 —	25 —	A résisté.
	20 —	A résisté.	—
	21 —	—	—
	22 —	—	—
	23 —	28 jours.	—
	24 —	A résisté.	—
	25 —	—	—

Les résultats ont été de même ordre que ceux obtenus pour les moelles conservées dans le vide :

La présence du gaz acide carbonique ne paraît pas avoir d'influence sur la conservation de la virulence.

1° Au froid, les moelles donnaient encore la rage au bout de 5 mois.

2° A 23°, la durée maxima de virulence était de 36 jours environ.

3° A 35°, elle est de 19 à 23 jours.

C. *Moelles conservées dans l'hydrogène.*

La même expérience a été faite avec l'hydrogène au lieu d'acide carbonique, à la température de 23°.

TABLEAU III

DURÉE DE SÉJOUR DES MOELLES à 23°	DURÉE D'INCUBATION	
	LAPIN	COBAYE
15 jours.	9 jours.	9 jours.
16 —	11 —	15 —
17 —	10 —	11 —
18 —	10 —	14 —
19 —	9 —	10 —
20 —	8 —	8 —
21 —	13 —	10 —
22 —	10 —	10 —
23 —	15 —	9 —
24 —	8 —	9 —
25 —	10 —	12 —
26 —	9 —	10 —
27 —	8 —	7 —
28 —	9 —	11 —
29 —	10 —	A résisté.
30 —	A résisté.	—
31 —	—	—
32 —	17 jours.	12 jours.
33 —	9 —	15 —
34 —	13 —	10 —
35 —	A résisté.	A résisté.
36 —	—	—
37 —	—	18 jours.
38 —	17 jours.	20 —
39 —	A résisté.	A résisté.
40 —	—	—
41 —	—	—

Dans l'hydrogène à 23°, les moelles étaient encore virulentes au bout de 38 jours.

Ce n'est peut-être pas là la durée maxima de la virulence. Mais, après le 38e jour il est difficile de conserver les moelles pures. Pour avoir une expérience réussie, il était nécessaire de la répéter 3 ou 4 fois. Cela tient à la diffusion des germes de l'air qui se dépose sur les tronçons de moelles au moment de leur extraction sur le lapin, opération qu'il est difficile de faire à l'abri de l'air.

D. — Lorsqu'on conserve de même les moelles rabiques, par comparaison, dans l'air humide, la durée de la virulence est beaucoup moins longue. Déjà, à partir du 10e jour à la température de 23°, elles sont sans action sur les animaux.

Il résulte donc de cette première série d'expériences, que les moelles rabiques humides restent très longtemps virulentes, dans le vide, dans l'hydrogène et dans l'acide carbonique. Ce dernier gaz, qui exerce une véritable action antiseptique sur un grand nombre de microbes, ne fait pas périr le virus rabique, ainsi que M. Pasteur l'avait déjà constaté.

La durée du virus rabique est sensiblement la même dans le vide, dans l'hydrogène et dans l'acide carbonique. La chaleur, en l'absence de l'air, agit sur le virus pour hâter sa mort. L'air exerce une influence très marquée sur les moelles rabiques humides : le virus périt dans l'air beaucoup plus vite que dans le vide, et les gaz inertes.

II

INFLUENCE DE LA DESSICCATION DES MOELLES CONSERVÉES DANS LE VIDE AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES.

Dans tous les cas précédents, les moelles rabiques, suspendues dans le vide ou les gaz inertes, ne subissent aucune dessiccation; elles restent tout à fait molles jusqu'à la fin des expériences.

Les choses sont toutes différentes lorsqu'on opère dans le vide sec; les moelles alors se dessèchent vite et perdent plus rapidement leur virulence.

Les expériences ont été faites comme il a été indiqué au

paragraphe I, avec cette différence que les ballons contenaient à la partie inférieure des morceaux de potasse caustique.

TABLEAU IV

DURÉE DE SÉJOUR DES MOELLES		DURÉE D'INCUBATION	
		LAPIN	COBAYE
Entre —4° et +4°.	7 jours.	A résisté.	A résisté.
	8 —	12 jours.	—
	9 —	13 —	13 jours.
	10 —	A résisté.	A résisté.
	11 —	10 jours.	10 jours.
	12 —	14 —	14 jours.
	13 —	A résisté.	A résisté.
	14 —	10 jours.	10 jours.
	15 —	9 —	A résisté.
	16 —	9 —	—
	17 —	12 —	12 jours.
	18 —	11 —	11 —
	19 —	A résisté.	A résisté.
	20 —	—	—
	21 —	—	—
A 23°.	2 —	7 jours.	7 jours.
	3 —	9 —	9 —
	4 —	8 —	A résisté.
	5 —	10 —	11 jours.
	6 —	8 —	A résisté.
	7 —	11 —	—
	8 —	8 —	—
	9 —	A résisté.	—
	10 —	—	—
	15 —	—	—
A 35°.	24 heures.	10 jours.	10 jours.
	48 —	9 —	9 —
	3 jours.	A résisté.	A résisté.
	4 —	—	—

1° Dans le vide sec et au froid, les moelles rabiques ne conservent pas leur virulence au delà de 18 jours.

2° A 23°, les moelles ne restent virulentes que huit jours.

3° A 35°, elles ne restent virulentes que 48 heures.

En comparant ces résultats à ceux qui ont été obtenus sans dessiccation, on reconnaît que celle-ci a une influence considérable sur la durée de la virulence des moelles rabiques.

Ainsi, au froid, cette durée est de plus de 5 mois dans le vide à l'humidité, et de 18 jours seulement dans le vide sec;

A 23°, la virulence ne se conserve que 8 jours dans le vide sec, au lieu de 33 jours dans le vide à l'humidité.

Lorque les moelles sont desséchées à 35°, la durée de conservation de la virulence n'est que de 48 heures à sec, au lieu de 22 jours dans le vide à l'humidité.

III

INFLUENCE DE L'OXYGÈNE DE L'AIR.

L'oxygène de l'air a une grande influence pour diminuer la durée de la conservation du virus dans les moelles rabiques de passage, même lorsque la dessiccation n'intervient pas.

Les expériences, pour déterminer cette action, ont été effectuées à la température de 23°.

Pour les expériences dans l'air confiné, le flacon stérilisé dans lequel on conservait la moelle était fermé par un bouchon flambé et bouché à la cire. Les moelles se conservent ainsi sans dessécher et ne subissent que l'action de l'oxygène resté dans le flacon.

Pour produire la dessiccation dans un air renouvelé, le flacon portait en bas une tubulure fermée, comme le goulot, par un tampon de coton. Enfin, pour dessécher les moelles plus vite, on mettait de la potasse en morceaux au fond de ce flacon, comme cela se fait pour la préparation des moelles dans le service de la rage.

On trouvera à la page suivante le tableau qui résume mes expériences.

On y voit que dans l'air confiné, les moelles cessent d'être virulentes à partir du 10e jour. La virulence se conserve à peu près le même temps dans l'air renouvelé, et s'éteint au bout de 6 jours dans l'air sec.

Dans la préparation des vaccins antirabiques, les moelles sont exposées, à l'abri de la lumière, à l'action simultanée de la chaleur, de l'air et de la sécheresse. Chacun de ces agents est capable de diminuer la virulence ; en agissant simultanément, leur influence s'ajoute. Mais à la température de 23°, qui est

celle que subissent les moelles destinées aux inoculations antirabiques, c'est à l'action de l'air et surtout de la dessiccation qu'est due pour la majeure partie la disparition de la virulence.

TABLEAU V

DURÉE DE SÉJOUR DES MOELLES A 23°		DURÉE D'INCUBATION	
		LAPIN	COBAYE
Air confiné, sans potasse.	3 jours.	7 jours.	9 jours.
	4 —	7 —	8 —
	5 —	7 —	10 —
	6 —	9 —	A résisté.
	7 —	9 —	11 jours.
	8 —	A résisté.	A résisté.
	9 —	7 jours.	—
	10 —	A résisté.	—
	11 —	—	—
	12 —	—	—
	13 —	—	—
	14 —	—	—
Air renouvelé, sans potasse.	4 —	9 jours.	10 jours.
	5 —	9 —	11 —
	6 —	9 —	9 —
	7 —	A résisté.	A résisté.
	8 —	11 jours.	—
	9 —	10 —	15 jours.
	10 —	A résisté.	A résisté.
	11 —	—	—
	12 —	—	—
	13 —	—	—
	14 —	—	—
Air renouvelé, en présence de potasse.	3 —	6 jours.	8 jours.
	4 —	6 —	8 —
	5 —	7 —	A résisté.
	6 —	11 —	7 jours.
	7 —	A résisté.	A résisté.
	8 —	—	—
	9 —	—	17 jours.
	10 —	—	A résisté.
	11 —	—	—
	12 —	—	—
	13 —	—	—
	14 —	—	—

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CULTURE

DES

BACTÉRIES SUR LES MILIEUX COLORÉS,

PAR M. LE Dr E. LEGRAIN.

Depuis les travaux de Nœggerath et de Gasser sur la culture des bactéries dans les milieux colorés, j'ai tenté systématiquement la culture d'un grand nombre de bactéries sur les milieux nutritifs teints au moyen d'une solution aqueuse de fuchsine.

Sans parler de diverses bactéries chromogènes, dont le pigment donne avec la fuchsine un mélange de couleurs, j'ai trouvé un bacille pathogène qui, plus rapidement que le bacille d'Eberth et que celui d'Escherich, décolore les milieux de culture colorés à la fuchsine. Ce bacille, que j'ai rencontré en quantité énorme dans les crachats d'un phtisique, est à peine deux fois aussi long que large. Il est très mobile ; coloré par la fuchsine, il présente deux pôles fortement teintés et un espace central presque clair. Il se décolore par la méthode de Gram.

Il se cultive très facilement sur les divers milieux. Le bouillon est troublé au bout de 10 heures à l'étuve ; il se forme ensuite un léger voile crémeux, n'adhérant pas aux parois du tube, qui se désagrège au moindre choc et tombe au fond du tube en donnant un dépôt blanchâtre.

Les premières cultures liquéfient rapidement la gélatine ; mais dans les cultures successives, la liquéfaction devient de plus en plus tardive ; elle peut même faire défaut entièrement. Sur gélose, on obtient, après 24 heures à l'étuve, une bande d'un blanc grisâtre peu épaisse, atteignant un centimètre de largeur. Mélangé à de la gélose fondue sur le point de se solidifier, ce bacille se développe en donnant de nombreuses bulles de gaz à l'intérieur de la gelée.

Sur pomme de terre, il donne une culture un peu jaunâtre qui brunit dans la suite.

Il décompose l'albumine après l'avoir peptonisée, en donnant des produits à odeur infecte.

Par ses caractères de culture, ce bacille se rapproche beaucoup du bacille trouvé par MM. du Cazal et Vaillard dans une « affection parasitaire de l'homme transmissible au lapin », décrite par ces auteurs dans le numéro des *Annales* du mois de juin dernier. Les résultats fournis par l'inoculation des cultures aux animaux d'expérience sont de nature à établir l'identité de ces deux bacilles.

Les souris meurent très rapidement de septicémie ; à forte dose, les lapins sont tués en 2 à 3 jours; à dose plus faible, ils présentent, au bout de quinze jours, des tumeurs multiples en divers points du corps; ces tumeurs se ramollissent au centre, finissent par s'ulcérer, et les animaux guérissent après l'élimination d'une masse caséeuse.

Mais je veux seulement dans cette note mettre en lumière un côté spécial de la biologie de ce bacille : sa manière de se comporter sur les milieux colorés.

La gélose et le bouillon *neutres*, colorés avec une solution aqueuse de fuchsine, sont très rapidement décolorés par ce bacille. Dans le bouillon coloré, il s'est formé, après décoloration du milieu, un dépôt rouge au fond du tube; ce dépôt finit lui-même par prendre une teinte grisâtre, et toute trace de rouge disparaît. Sur gélose, il se forme une bande colorée comme dans les cultures du bacille typhique et du bacille du côlon; la gélose se décolore complètement et, au bout d'une dizaine de jours, la bande rouge qui représente la culture est elle-même devenue complètement incolore.

Après le développement du bacille, tous les milieux présentent une réaction fortement alcaline [1]. Voici quelques expériences qui montrent que la substance alcaline, produite par le développement de ce bacille, joue un rôle important dans la décoloration des cultures.

a) En ensemençant simultanément des milieux identiques contenant la même quantité de substances nutritives et la même proportion de colorant, mais de réactions différentes, les uns étant franchement acides, d'autres neutres et d'autres enfin alcalins, on trouve que les milieux alcalins sont décolorés les premiers; puis les milieux neutres. Les milieux acides sont tar-

1. Cette particularité est notée dans le mémoire de MM. du Cazal et Vaillard.

divement décolorés ; ils peuvent même ne subir qu'une diminution de teinte d'autant moins sensible qu'ils étaient plus acides ;

b) Les milieux, légèrement acidulés, ne commencent à subir une décoloration appréciable que quand, par le fait du développement de la culture, ils possèdent une réaction nettement alcaline ;

c) En ajoutant à des milieux de culture, complètement décolorés par le bacille, quelques gouttes d'une solution d'acide tartrique, de façon à donner au milieu une réaction légèrement acide, la coloration réapparaît aussi intense qu'avant culture ;

d) En distillant un ballon de bouillon normal où s'est développé le bacille, et en recevant le produit de la distillation dans une solution aqueuse de fuchsine, cette dernière se décolore. Elle se recolore lorsqu'on y ajoute un cristal d'acide tartrique. A la distillation, il passe surtout une ammoniaque composée.

Il semble y avoir une réaction simple entre le sel de rosaniline employé pour la coloration du milieu et la substance basique produite par le développement du bacille : la base déplace la rosaniline, qui est incolore, de son sel coloré. Si on ajoute un acide, la teinte reparaît.

Cette influence de l'alcalinisation sur la décoloration des milieux à la fuchsine rappelle l'action des acides sur la fonction chromogène de certaines bactéries. Hueppe a vu le bacille du lait bleu ne colorer que les laits acides ; Wasserzug a rendu au *Micrococcus prodigiosus* sa fonction chromogène en le cultivant sur des milieux acides. En laissant, pour le moment, de côté l'influence des autres éléments du milieu de culture sur la production de la couleur, et en ne s'attachant qu'à l'influence de l'acide, on peut expliquer ces faits en admettant que, dans les deux cas ci-dessus, la matière colorante est formée de l'union d'un acide avec une base incolore, qui, mise en liberté par l'ammoniaque ou la triméthylamine de la culture, la laisse incolore tant qu'il n'y a pas assez d'acide pour reformer le sel coloré.

Mais cette hypothèse, qui consiste à rapprocher certains pigments bactériens des couleurs d'aniline, ne pourra être sûrement vérifiée ou infirmée que le jour où l'étude de leur composition chimique sera plus avancée.

Laboratoire de bactériologie de l'hôpital militaire de Lille.

STATISTIQUE
DU TRAITEMENT ANTIRABIQUE A VARSOVIE,

PAR M. O. BUJWID.

A Varsovie, comme dans les autres instituts antirabiques, le nombre proportionnel des morts a diminué à mesure que le traitement devenait plus intensif. En 1886, sur 104 personnes ayant subi le traitement simple, il n'y a eu qu'un seul cas de mort. Pendant les 8 mois de l'année 1887 où j'ai mis en œuvre un traitement plus affaibli, ne remontant pas au delà de la moelle de 6 et même 7 jours, j'ai eu 9 cas de mort sur 193 personnes traitées. Pendant les derniers mois de 1887 et toute l'année 1888, il n'y a eu aucun cas de mort sur les 379 personnes ayant subi le traitement intensif.

En 1889, il y a eu 343 traités et 3 morts, dont un seul avait subi le traitement vraiment intensif : c'était un enfant de 5 ans, mordu fortement à la joue droite par un chien, et qui a reçu 12 injections de moelles de 10 à 2 jours, en deux séries. Les deux autres personnes mortes n'avaient reçu qu'une série de moelles fortes, leurs blessures semblant peu graves.

En 1890, sur 448 personnes ayant subi le traitement intensif complet, nous n'avons eu qu'un cas de mort, chez un enfant de 3 ans mordu grièvement à la joue droite.

Il faut ajouter que, dans ces dernières années, nous avons fait un choix plus sévère parmi ceux qui se présentent au traitement, et dont nous éliminons de 25 à 30 0/0; nous renonçons, par exemple, dans tous les cas de morsures légères au travers de vêtements grossiers, surtout en drap. Quand la rage du chien n'est pas sûre, et que l'animal peut être mis en observation, nous attendons que la rage ait apparu pour commencer le traitement. Il y a eu en 1890 beaucoup de cas pareils que nous avons inscrits à la colonne C du tableau et qu'on pourrait aussi bien inscrire en A.

Nous n'avons fait qu'une modification à la méthode de traitement décrite en 1889 dans ces *Annales*, c'est que nous commençons par la moelle de 8 jours et finissons par celle de 2 jours. En hiver, nous commençons quelquefois par la moelle de 10 jours, et nous supprimons la moelle de 2 jours, dans la première série, pour les cas les plus légers.

1889

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure ..... simples..		1	3		»	4		9	18
Morsures à la tête et à la figure ..... multiples.		2			4			9	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	2	»	»
— *inefficaces*.....	3	»	»	4	»	»	16	»	»
Pas de cautérisations.....									
Morsures aux mains... simples..		25	59		11	26		50	114
Morsures aux mains... multiples.		34			15			64	
Cautérisations efficaces.....	1	»	»	»	»	»	2	»	»
— *inefficaces*.....	11	»	»	7	»	»	22	»	»
Pas de cautérisations.....	47	»	»	19	»	»	90	»	»
Morsures aux membres et au tronc ..... simples..		18	39		6	7		33	73
Morsures aux membres et au tronc ..... multiples.		21			1			40	
Cautérisations efficaces,.....	»	»	»	1	»	»	3	»	»
— *inefficaces*.....	5	»	»	1	»	»	11	»	»
Pas de cautérisations.....	33	»	»	5	»	»	59	»	»
Habits déchirés.....	24	»	»	6	»	»	61	»	»
Morsures à nu.....	77	»	»	31	»	»	144	»	»
Totaux.....			101			37			205

	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL.....	313		

1890

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure ..... simples....	»	1	2	»	4	7	»	15	31
Morsures à la tête et à la figure ..... multiples...	»	1		»	3		»	16	
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*.....	»	»	»	4	»	»	10	»	»
Pas de cautérisation.....	2	»	»	3	»	»	20	»	»
Morsures aux mains ..... simples.....	»	7	19	»	27	50	»	109	212
Morsures aux mains ..... multiples...	»	12		»	23		»	103	
Cautérisations efficaces.....	1	»	»	1	»	»	7	»	»
— *inefficaces*.....	3	»	»	18	»	»	64	»	»
Pas de cautérisation.....	15	»	»	31	»	»	141	»	»
Morsures aux membres et au tronc ..... simples.....	»	»	11	»	1	20	»	3	96
Morsures aux membres et au tronc ..... multiples...	»	11		»	19		»	93	
Cautérisations efficaces.....	»	»	»	»	»	»	2	»	»
— *inefficaces*.....	2	»	»	3	»	»	30	»	»
Pas de cautérisation.....	9	»	»	17	»	»	44	»	»
Habits déchirés.....	14	»	»	24	»	»	101	»	»
Morsures à nu.....	18	»		53	»	»	238	»	»
Totaux.....	..		32	..	...	77	...	....	339

	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL.....	448		

REVUES ET ANALYSES

LES MATIÈRES ALBUMINOÏDES

REVUE CRITIQUE.

O. Hammarsten. *Lehrbuch d. phys. Chemie. Wiesbaden*, 1891. — A. Gautier. Cours de chimie biologique. *Paris*, Savy, 1891. — Aronstein. Sur la préparation des solutions d'albumine sans sels. *Dissert. Dorpat*, 1871. — Rosenberg. Recherches comparées sur l'alcali-albumine, l'acidalbumine et l'albumine. Thèse, *Dorpat*, 1883. — Graham. Sur l'état colloïdal de la matière. *Journal of the Chem. Soc.*, t. III, IV, XV de la première série; t. II de la seconde et *Annales de Chim. et de Phys.*, troisième série, t. XV. — O. Maschke. *Bot. Zeitung*, 1859. — Weyl. *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. I, 1877. — O. Schmiedeberg. *Id.* t. I, 1877. — E. Drechsel. *Journal f. pract. Chemie. N. F.*, t. XIX, 1879. — G. Grubler. Sur l'albumine cristallisée des semences de courges. *Id.*, t. XXIII, 1881. — Ritthausen. *Id.*, t. XXV, 1882. — O. Zinoffski. Sur la grandeur de la molécule d'hémoglobine. *Dissert. Dorpat*, 1885. — A. Jaquet. Contribution à la connaissance de la matière colorante du sang. *Dissert. Bâle*, 1889. — E. Harnack. *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. V, 1881. — O. Löw. *Pflüger's Archiv.*, t. XXXI, 1883. — Schutzenberger. *Annales de Chim. et de Phys*, cinquième série, t. XVI, et *Comptes rendus*, t. CXII. — Duclaux. Action de la lumière solaire sur les substances hydrocarbonées. *Annales de l'Institut Agron.*, 1887. — Salkowski. *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. XII.

La langue de la microbiologie a ses modes et ses caprices. Il y a deux ans, on n'entendait parler que des ptomaïnes, toujours suivies des inévitables leucomaïnes. Sans qu'on sût bien encore ce qu'ils servaient à désigner, ces mots faisaient bien dans le discours, et telle a été une des causes de leur vogue. A mesure que les substances auxquelles ils s'appliquaient ont été mieux connues, elles ont semblé moins dignes du rôle qu'on leur faisait jouer, et tout en rendant aux travaux de Brieger, de Gautier, la justice qu'ils méritent, on s'est tourné d'un autre côté, et on a ouvert la carrière aux globulines, albumines, albumoses, toxalbumoses, toxopeptones, etc. On en trouve dans tous les mémoires scientifiques, et elles menacent de tout envahir.

Qu'y a-t-il derrière ces expressions protéiformes? S'appliquent-elles à des composés définis, dignes de prendre place dans la science? Faut-il au contraire n'y voir que des noms provisoires, traduisant pour les initiés, masquant pour les autres l'imperfection de nos connaissances? Telle est la question que je voudrais examiner dans une suite de *Revues critiques* dont je puis tout de suite donner la conclusion, à l'usage de ceux qui croiraient ne pas devoir me suivre. Cette conclusion, c'est que dans le mélange de foi et de scepticisme qu'il faut apporter dans l'étude de toutes les questions scientifiques, c'est le scepticisme qui doit l'emporter au sujet de la différenciation des matières albuminoïdes.

I

Et d'abord, avant d'entrer dans le détail des espèces, adressons-nous au nom de genre. Qu'est-ce qu'une matière albuminoïde? Comment la définir? Il n'est pas facile de répondre à cette question, et quand on la creuse, on s'aperçoit qu'on obscurcit plus qu'on ne l'éclaire l'idée que chacun a des matières albuminoïdes en pensant à l'albumine de l'œuf, à la caséine du lait, à la fibrine du muscle, etc.

Ces matières n'ont en effet aucune propriété physique commune. L'albumine se coagule à la chaleur, est soluble dans les liqueurs acides; la caséine résiste à l'ébullition, et se précipite par l'acide acétique. La fibrine est soluble dans le sang et insoluble dans le muscle. Toutes ces substances, lorsqu'elles sont en solution, sont lévogyres. Mais leur pouvoir rotatoire varie d'une substance à l'autre, et même quelquefois dans une seule et même substance. Ce pouvoir rotatoire d'ailleurs s'est révélé à nous, dans ces derniers temps, comme un fait si contingent, qu'on ne saurait lui demander de devenir une caractéristique ni un moyen de classification.

Adressons-nous maintenant aux caractères chimiques. Toutes les matières albuminoïdes contiennent de l'azote. Leur composition chimique est-elle bien définie, c'est-à-dire à peu près constante pour la même substance et variable d'une substance à l'autre? Dans le premier cas, l'exemple des sucres nous montrerait qu'il ne faut pas conclure de l'unité de composition à l'unité de substance. Dans le second, l'exemple des corps gras nous prouverait que la différence de composition n'exclut pas une certaine unité de constitution. Mais dans l'un comme dans l'autre, il y aurait un pas de fait vers la découverte de la vérité. Malheureusement, aucun d'eux ne se réalise. A des albumines authentiques, on trouve des compositions différentes, et il y des caséines qui ont la même composition que des albumines; si bien que tout ce qu'on

peut dire de général sur ce sujet, c'est que les éléments des matières albuminoïdes varient dans les limites suivantes :

Carbone	de 50,6	à 54,5	soit une	variation de	8 0/0
Hydrogène	6,5	7,3	—	—	12 0/0
Azote	15,0	16,5	—	—	10 0/0
Oxygène	21,5	23,5	—	—	10 0/0

Je laisse de côté le soufre, qu'on rencontre aussi dans toutes les matières albuminoïdes, dont la proportion varie de 0,8 à 2.2 0/0, soit de 200 0/0 de sa plus petite valeur, et le fer, dont la variation est peut-être encore plus grande. Ces éléments sont en petite quantité, et leur variation peut être plus sensible, sans avoir pour cela plus d'importance que celle des autres éléments. En résumé, l'étude de la composition élémentaire nous laisse dans l'état d'incertitude où nous étions avant de l'avoir faite.

Parmi ces matériaux constituants de la molécule albuminoïde, je n'ai pas fait figurer les matières minérales, qui paraissent au premier abord n'en pas faire partie, car elles y sont contenues, soit à l'état de poudre extrêmement divisée, maintenue en suspension par le caractère muqueux de la matière, soit à l'état soluble, et dans ce dernier cas, on peut les éliminer facilement en soumettant le tout à la dialyse. Mais à mesure que cette dialyse se poursuit, on s'aperçoit que les sels solubles qu'elle entraîne n'étaient pas du tout aussi indifférents qu'on aurait pu le croire, et que leur disparition amène celle d'une partie des propriétés les plus caractéristiques de la matière albuminoïde. De l'albumine dialysée pendant quelques heures devient faiblement opaque, et bouillie à cet état, louchit sans se coaguler, en donnant au liquide une transparence de nacre. Cette albumine faiblement opaque redevient transparente comme du cristal si on y ajoute une petite quantité de sel marin, et, bouillie, donne son coagulum ordinaire. Si on poursuit la dialyse au delà de ce terme, on arrive à obtenir un liquide ne contenant que 0,35 à 0,40 0/0 de cendres, au lieu de 2 à 4 0/0, mais qui ne se coagule plus, louchit à peine par la chaleur, et qu'on dirait ne plus contenir d'albumine, si on ne l'y retrouvait avec ses propriétés initiales, à la condition seule d'y réintroduire les sels que la dialyse avait enlevés.

Voilà donc que nous découvrons que la coagulabilité, c'est-à-dire la seule propriété qui nous permette de séparer les matières albuminoïdes des liquides qui les contiennent d'ordinaire, et qui nous a fourni celles que nous avons analysées plus haut, que cette coagulabilité, dis-je, est un phénomène contingent, pouvant manquer ou se produire suivant la nature et la proportion des sels présents dans la liqueur. Cela ne suffirait pas pour le faire rejeter comme moyen de précipitation. Il y a beaucoup d'autres réactions chimiques, très utiles et très souvent

employées, qui ne se produisent que dans certaines conditions de milieu que l'expérience a appris à connaître. Mais ce qui doit redoubler notre défiance vis-à-vis de cette mystérieuse coagulation, dont on fait trop souvent la pierre angulaire de la science des matières albuminoïdes, c'est qu'elle n'est pas particulière à ces substances, qu'elle paraît n'avoir aucun lien avec la constitution de leurs molécules, puisqu'on la trouve avec tous ses caractères, dans des corps de composition plus simple, la silice, par exemple, ou l'alumine, ou l'oxyde de fer, ou même, d'après M. Grimaux, le cuivre.

En dissolvant du silicate de soude dans un excès d'acide chlorhydrique, et en soumettant le tout à la dialyse jusqu'à complète élimination du sel marin formé et de l'acide en excès, on obtient, comme Graham l'a montré, un liquide limpide ou à peine louche, passant au travers des filtres comme l'albumine de tout à l'heure, et qui supporte l'ébullition, mais se coagule immédiatement si on y ajoute quelques gouttes de solution d'un carbonate alcalin ou alcalino-terreux. Une solution chlorhydrique d'alumine, dialysée de même, donne un liquide tellement instable qu'on ne peut le transvaser d'un vase dans un autre sans le voir se coaguler, comme du sang qu'on reçoit d'une veine dans un verre. La coagulation est moins prompte dans la solution d'alumine, quand on la transvase dans un verre qu'on vient de laver à l'eau distillée, absolument comme celle du sang ou du plasma se ralentit dans un verre bien mouillé d'eau ou de sang défibriné, ou recouvert d'une couche de vaseline. L'acétate de fer dialysé donne un liquide que l'acide sulfurique coagule, comme il le fait du lait et des solutions de caséine.

Nous retrouverons et nous discuterons, dans la série de ces études, ces questions de coagulation. Je ne les vise en commençant que pour noter leur caractère instable, et faire remarquer qu'elles n'ont aucune relation directe avec la matière albuminoïde, puisqu'on les retrouve pour des substances purement minérales. Elles ne sont même nullement en rapport avec le degré de complication de la molécule, puisqu'on les retrouve à tous les degrés de l'échelle : pour les matières albuminoïdes, dont le poids atomique est certainement très élevé, pour les gommes qui sont moins complexes, pour l'alumine et la silice où l'édifice moléculaire est très simple. Ce sont sans doute les modes de groupement des molécules qui produisent l'état colloïdal, mais il semble n'avoir rien à faire avec l'édifice moléculaire lui-même.

II

Il y a une autre conclusion à tirer de ce rapprochement entre la coagulation des matières albuminoïdes et celle d'autres substances minérales ou organiques. Tous ces précipités, qui se forment dans toute la liqueur et y présentent, avant d'avoir subi leur rétraction, une surface très grande, s'y imprègnent souvent, par voie de teinture, des matériaux présents, qui se déposent sur leurs filaments ou s'enchevêtrent dans leurs mailles, si bien qu'ils appauvrissent la liqueur ou changent sa constitution. Ces précipités muqueux, gélatineux, sont très redoutés des chimistes, qui savent avec quelle patience il faut les laver pour leur enlever les sels entraînés, même les plus solubles. En teinture, l'influence des mordants alumineux est aussi bien connue. On sait de même que lorsqu'une matière albuminoïde s'est coagulée dans une liqueur, elle entraîne avec elle certains sels, en laisse d'autres, laisse la liqueur plus ou moins acide qu'auparavant. Du coup, nous voilà amenés à nous inquiéter au sujet de toutes les notions analytiques que nous venons de résumer, et qui toutes ont été établies sur des matières albuminoïdes coagulées ou précipitées, c'est-à-dire probablement impures. Ne pourrait-il pas se faire que les variations constatées dans les proportions de carbone, d'azote, etc., tiennent à un mélange de matières qui s'entraîneraient mutuellement dans leur précipitation, comme Graham l'a observé si souvent pour la silice, l'alumine, que la gélatine entraîne avec elle en se précipitant? Ne pourrions-nous pas au moins nous expliquer ainsi cette variabilité que nous avons notée dans la proportion et dans la composition des matières minérales? Quand on veut avoir la composition exacte de la silice, de l'alumine, on ne s'adresse pas à leurs précipités gélatineux, on la demande au quartz, au rubis. Nous pourrions peut-être sortir de même d'embarras au sujet des matières albuminoïdes, si nous en trouvions des échantillons cristallisés, qu'on pourrait analyser avec quelque sécurité.

Il existe des combinaisons de cet ordre. On connaît depuis longtemps, dans les graines et les bulbes de certaines plantes, la noix de Para, les semences de courges, de chanvre, de ricin, des granules microscopiques, à formes demi-cristallines, nommés *grains d'aleurone;* on trouve de même dans le vitellus des œufs de différents animaux, des *plaques vitellines*, qu'on isole par des moyens appropriés, et qui présentent les réactions des matières albuminoïdes. Maschke, Schmiedeberg, Drechsel ont successivement étudié et analysé ces cristalloïdes. Mais le travail le plus complet qu'on ait fait sur eux est celui que

Grubler a exécuté sous la direction de Drechsel. Ce savant a séparé les cristalloïdes des semences de courges en les dissolvant à 40° en présence de chlorures alcalins ou du sulfate de magnésie, et en laissant refroidir très lentement les solutions. Il a ainsi obtenu des octaèdres réguliers, ne laissant, quand on les calcinait, que un ou deux millièmes de cendres, où on trouvait des alcalis, de la chaux, du fer, de la magnésie et de l'acide phosphorique. Voici les résultats de l'analyse élémentaire de 3 échantillons de ces cristaux, provenant du traitement par le chlorure de sodium (*A*), le chlorure d'ammonium (*B*), et le sulfate de magnésie (*C*). L'analyse D est celle d'une combinaison cristalline de la même substance avec la magnésie, supposée débarrassée de magnésie et de cendres.

	A	B	C	D
Carbone	53.21	53.55	53.29	52.98
Hydrogène	7.22	7.31	6.99	7.25
Azote	19.22	19.17	18.99	18.99
Oxygène	19.10	18.70	19.47	19.81
Soufre	1.07	1.16	1.13	0.97
Cendres	0.18	0.11	0.13	» »
	100.00	100.00	100.00	100.00

On voit que toutes ces analyses sont assez concordantes, beaucoup plus que les analyses diverses de la même matière albuminoïde. Il semble donc que nous ayons gagné d'un premier côté, du côté de la constance de composition du produit analysé. Nous sommes alors conduits à étudier de même les cristalloïdes d'une autre graine, et à voir si tous ces cristalloïdes se ressemblent entre eux. Nous pouvons aussi, dans le même ordre d'idées, comparer ces divers cristalloïdes à l'hémoglobine. qui est aussi formée de la combinaison d'une matière albuminoïde avec un corps contenant du fer, l'hématine. Voici les analyses des cristalloïdes des graines de chanvre et de ricin, faites par Rithausen, et celle que Zinoffky a faite sur l'hémoglobine du sang de cheval purifiée par plusieurs cristallisations, et analysée au moment où la proportion de fer dans le résidu des eaux mères était la même que dans les cristaux desséchés.

	Chanvre	Ricin	Hémoglobine
Carbone	50.92	50.85	51.15
Hydrogène	6.91	6.97	6.75
Azote	18.71	18.55	17.94
Oxygène	22.53	22.80	23.43
Soufre	0.82	0.77	0.39
Cendres	0.11	0.06	0.34
	100.00	100.00	100.00

On voit que les deux premières analyses sont encore assez concordantes entre elles, mais diffèrent sensiblement, surtout pour l'oxygène e, le carbone, de celles des cristalloïdes de la courge. Elles se rapprochent davantage de celle de l'hémoglobine de sang de cheval. Mais il résulte des nombres publiés par Jacquet que l'hémoglobine du sang de cheval n'a pas la même composition élémentaire que l'hémoglobine du sang de chien, et en diffère au moins autant que les cristalloïdes de la courge de ceux du ricin, de sorte qu'en acceptant comme exacts les résultats de toutes ces analyses, nous trouvons là ce que nous n'avions pas constaté au même degré pour les matières albuminoïdes, une constance assez grande de composition dans la même espèce, une variabilité sensible d'une espèce à l'autre.

Mais à côté de cette constatation encourageante, nous avons à en placer une autre toute différente, c'est qu'il n'est pas du tout sûr que nous ayons encore affaire à de véritables matières albuminoïdes. Pour l'hémoglobine, elle en diffère surtout par son instabilité. Chimiquement et physiologiquement, la matière albuminoïde est un corps très stable. L'hémoglobine s'oxyde et se réduit, se combine à une foule de corps. Les cristalloïdes sont plus stables, mais on peut soulever à leur sujet une autre objection. Sans passer en revue tous les chiffres des analyses faites sur eux, il en est un qui doit nous frapper, c'est celui de 19 0/0 pour l'azote. Aucune matière albuminoïde n'en contient autant. On avait accepté autrefois le chiffre de 16 0/0. M. Dumas avait trouvé 16,5 0/0 d'azote dans la caséine de lait de chienne, mais, depuis, toutes les analyses, celles de Scherer, de Muller, de Wölcker, de Musso et Menozzi sont restées au-dessous de 16 0/0, et sont même tombées à 14. Storch, en étudiant le fromage, a encore trouvé des nombres plus faibles, allant jusqu'à 13,7. Voilà qu'avec les cristalloïdes, nous remontons tout de suite à 19 et au-dessus. Si ces cristalloïdes sont la véritable matière albuminoïde, il faut admettre que tout ce qu'on a connu et analysé sous ce nom était un mélange de matières albuminoïdes et de matières plus pauvres en azote, que les traitements nombreux qu'on a fait subir aux produits d'analyse n'ont pu éliminer. Si on continue, au contraire, à considérer comme des types de matière albuminoïde la caséine du lait ou l'albumine de l'œuf, les cristalloïdes végétaux et l'hémoglobine ne sont déjà plus des matières albuminoïdes. On est conduit à en faire des dérivés de ces matières, lorsqu'on songe que le mode général de destruction des matériaux azotés dans l'organisme les transforme en produits de plus en plus cristallisables et de plus en plus azotés, jusqu'à l'urée, qui renferme 46 0/0 d'azote. On peut aussi y voir des produits de condensation moléculaire, en se rappelant qu'ils sont des aliments de réserve, et que beaucoup des aliments de réserve hydrocarbonés ne peuvent devenir assimilables

qu'en subissant un dédoublement avec hydratation préalable. Tels sont le saccharose, l'amidon, etc. Deux ou plusieurs molécules de matière albuminoïde, amorphe et incristallisable, se soudant entre elles par voie de déshydratation, de manière à former une anhydride, et éliminant ainsi les 30 ou 40 molécules d'eau dont certains faits y font admettre l'existence, pourraient donner, il y en a d'autres exemples en chimie, une combinaison cristallisable, et plus riche en azote que le groupement primitif. Telle est, je crois, en ce moment, la meilleure manière de se représenter les cristalloïdes albuminoïdes, et on voit, en résumé, que cette étude ne nous a guère fait avancer vers notre but : la connaissance de la constitution de la véritable molécule albuminoïde.

Restreignons nos exigences, et voyons si nous ne pourrions pas au moins savoir quel est son ordre de grandeur, c'est-à-dire quel est le nombre minimum de molécules de carbone, d'hydrogène, etc., qui y entrent. En partant, par exemple, de la combinaison magnésienne que nous avons vue plus haut analysée par Grubler, et qui contenait 0,45 0/0 de magnésie, on peut, en admettant qu'il n'y a qu'un atome de magnésie dans les cristaux, savoir ce qu'il y a d'atomes des autres éléments. On trouve naturellement ainsi, pour les éléments prédominants, des nombres entiers ou très voisins de l'être; mais pour le soufre, qui n'existe qu'en faibles proportions, on trouve que pour un atome de magnésie, il y en a 8/3 d'atome. On se trouve conduit ainsi à multiplier tous les nombres obtenus par 3, de façon à n'avoir pas de fraction, et on arrive à la formule

$$C^{1170}\ H^{1920}\ Az^{360}\ O^{322}\ S^{8}\ Mg^{3}$$

qui donne pour le poids atomique un chiffre dépassant 26,000. D'autres calculs, conduits de la même façon en parlant d'autres éléments, faits, par exemple, en prenant pour base du calcul, au lieu de la magnésie, la quantité de chaux ou de fer contenue dans le coagulum, ont conduit à des poids atomiques différents, généralement très élevés, mais dont nous devons discuter le degré de créance avant d'en tirer aucune conclusion.

Or, on ne saurait douter que ce degré de créance est faible. Il a, en effet, deux causes d'erreur dans le calcul. On en commet une quand on admet que la chaux, la magnésie, le fer, qu'on trouve dans l'analyse, sont en combinaison atomique avec la nature albuminoïde. Il y en a une portion qui peut être combinée, mais il y en a plus sûrement encore une partie retenue dans les mailles du précipité, ou maintenue à sa surface par des adhésions moléculaires. Si on comptait comme combinée à la caséine toute la chaux qu'on trouve dans le coagulum d'un lait coagulé par la présure, on commettrait une erreur notable,

car cette chaux y est en grande partie à l'état de phosphate, et comme on trouve de l'acide phosphorique même dans les cristalloïdes, ainsi que nous l'avons dit plus haut, comme on ne réussit pas à en éliminer toutes les matières minérales, il est bien probable que toute la magnésie que, dans le calcul précédent, nous mettions au compte de la matière albuminoïde, ne lui appartient pas.

On réduit l'importance de cette cause d'erreur, mais on ne la supprime pas en étudiant les coagulums formés, non par un sel de chaux ou de magnésie, mais par les sels de cuivre et d'argent, laissant dans le précipité des oxydes métalliques qu'on ne trouve jamais dans les matières albuminoïdes. Harnack a obtenu, en précipitant du blanc d'œuf par des solutions de sulfate de cuivre, et Lœw, en se servant de sels d'argent, des combinaisons malheureusement amorphes, mais qui ont des allures de composés définis, à en juger parce qu'elles contiennent une proportion à peu près constante de cuivre ou d'argent, quels que soient les rapports quantitatifs d'albumine et de sels métalliques qu'on ait fait réagir l'un sur l'autre. La substance préparée par Harnack, la seule dont on ait fait l'analyse élémentaire, contenait à peu près 2 atomes de soufre pour un de cuivre, et, en admettant qu'il n'y eût qu'un seul atome de ce dernier métal, le nombre d'atomes de carbone d'hydrogène, etc., était représenté par la formule suivante :

$$C^{204}\ H^{320}\ Az^{32}\ O^{66}\ S^{2}\ Cu$$

ce qui donne 4360 pour le poids atomique.

Mais ces nombres, comme les nombres relatifs à la formule des combinaisons cristalloïdes, sont affectés de la seconde cause d'erreur à laquelle nous faisions allusion plus haut, et due à la faible proportion des éléments sur lesquels on est obligé de tabler pour calculer le poids atomique. C'était tout à l'heure la proportion du soufre au magnésium qui nous le donnait, cette fois c'est la proportion du soufre au cuivre. Tous ces éléments sont en petite quantité, leur proportion est un peu variable. Le rapport entre ces proportions, duquel on conclut le rapport entre les nombres d'atomes, est par suite très incertain, et aucune de ces formules ne peut être considérée comme exacte.

Ici se présente une remarque importante. Les deux causes d'erreur que nous venons d'énumerer peuvent bien faire varier le rapport des éléments organiques, carbone, hydrogène, oxygène, azote, aux éléments minéraux, si ceux-ci sont évalués trop haut ou trop bas, mais ces mêmes causes d'erreur ne sauraient altérer le rapport des éléments organiques entre eux. En comparant les formules des cristalloïdes de la coureg à ceux de la matière analysée par Harnack, on trouve que

pour une même quantité de carbone il y a plus d'oxygène et moins d'azote dans la seconde. La différence n'est pas moins nette au sujet de l'hémoglobine. Celle de Zinoffsky avait pour formule :

$$C^{712}\ H^{1130}\ Az^{214}\ O^{245}\ Fe\ S^{2}.$$

Une autre hémoglobine, de sang de chien, analysée par Jacquet, a conduit à la formule suivante :

$$C^{758}\ H^{1203}\ Az^{195}\ O^{218}\ Fe\ S^{3}$$

ou il y a plus de carbone et moins d'azote et d'oxygène.

Il semble donc que nous soyons autorisés à conclure que toutes les matières albuminoïdes ne se ressemblent pas, et n'ont pas la même constitution.

Quelle est cette constitution ? Nous ne le savons pas encore. Tout ce qu'on peut remarquer à son sujet, c'est qu'elle aboutit à un chiffre élevé pour le poids atomique. On peut remarquer aussi que le poids atomique des combinaisons cristalloïdes est plus élevé que celui des combinaisons amorphes, ce qui est d'accord avec l'hypothèse qui y voit des anhydrides résultant de la soudure de plusieurs molécules. En somme, tout ce que nous avons appris jusqu'ici, c'est que la matière albuminoïde n'est pas *une*, et a une structure compliquée, dans laquelle entrent plusieurs milliers d'atomes divers. S'il était besoin de chercher une excuse à notre ignorance au sujet de la constitution de la molécule albuminoïde, on pourrait en trouver une dans ce degré de complication. Une molécule aussi volumineuse doit avoir une structure difficile à saisir.

Mais les chimistes ne se découragent pas facilement. Puisque cette molécule est trop compliquée pour qu'on puisse voir facilement sa structure, se sont-ils dit, tâchons de la disloquer, de la briser avec assez de ménagement pour que les morceaux n'en soient pas cassés ; quand nous l'aurons ainsi réduite en groupements plus simples, et quand nous connaîtrons ces groupements, il sera sans doute facile, à leur aide, de remonter à la constitution de la molécule albuminoïde initiale. C'est ainsi qu'en numérotant les pierres, on peut démolir et reconstruire un édifice quelconque. Telle est l'idée qui hante les chimistes depuis longtemps. Nous verrons dans une Revue prochaine à quoi elle a abouti.

DUCLAUX.

LA TUBERCULINE

REVUE CRITIQUE

M. le Professeur Koch vient de publier, dans le n° du 22 octobre de la *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, sa quatrième communication sur la tuberculine. Cette communication comprend deux parties: dans a première, l'auteur expose ses essais pour isoler le principe actif de la tuberculine ; dans la seconde il fait connaître le procédé qu'il emploie pour préparer la tuberculine brute.

Dès que l'on eut constaté que la tuberculine, telle qu'elle est vendue par M. Libbertz, n'est pas sans danger, et qu'elle peut provoquer, même à doses minimes, de véritables intoxications, on a pensé que ces phénomènes fâcheux étaient peut-être dus à des substances nuisibles mélangées au principe spécifique. D'après cette idée, qui procède de la doctrine que soutiennent M. Bouchard et ses élèves, plusieurs expérimentateurs se sont efforcés de débarrasser la tuberculine des corps qui ont une influence nocive, de manière à ne lui laisser que des qualités bienfaisantes. MM. Klebs et Hunter se sont engagés dans cette entreprise, et croient y avoir réussi au moins en partie. M. Koch, lui aussi, a fait un grand nombre d'expériences sur le même sujet: il les décrit tout au long dans sa note, en avertissant tout d'abord le lecteur qu'à son avis, la question n'est pas encore assez mûre, et qu'il remet à plus tard la comparaison de ses résultats avec ceux des autres observateurs, ainsi que l'éclaircissement des contradictions.

Dans un semblable travail, remarque M. Koch, il faut, à chaque pas, avoir recours au réactif animal, c'est-à-dire au cobaye tuberculeux. Un cochon d'Inde inoculé de la tuberculose depuis 4 à 5 semaines meurt sûrement si on lui injecte sous la peau cinq décigrammes de tuberculine brute. En partant de cette donnée, il est facile de se rendre compte de l'activité des produits que l'on obtient dans le cours des manipulations. Les lésions que l'on trouve chez les cobayes tuberculeux ainsi empoisonnés sont caractéristiques : elles consistent dans une congestion intense et générale, marquée par la teinte violacée du tissu sous-cutané au point de l'injection, par la coloration rouge foncé des ganglions voisins, de l'intestin, du foie et de la rate. A la surface de ces organes, particulièrement du foie, on voit des petites taches cnuptiformes, rouges noirâtres, semblables à des ecchymoses, et qui sont

dues à la dilatation des capillaires, obstrués d'hématies, autour des foyers tuberculeux. Cet aspect des taches sanguines sur le foie est pathognomonique.

Muni de ces indications, M. Koch s'est d'abord adressé à l'alcool pour purifier la tuberculine. Cette substance, mélangée à 5 fois son volume d'alcool, donne une masse brune, d'apparence résineuse, qui, séchée puis dissoute dans l'eau, a toutes les propriétés de la tuberculine. La portion qui reste en solution dans l'alcool se comporte de même, il n'y a donc pas eu de purification par ce procédé. Une partie de la tuberculine s'est précipitée, une partie est restée dissoute. On réalise une précipitation plus complète en faisant tomber la tuberculine goutte à goutte dans 20 à 25 fois son poids d'alcool absolu, et en lavant à plusieurs reprises le dépôt finement granuleux avec un égal volume d'alcool absolu. Pour avoir un produit blanc facile à pulvériser, il faut sécher dans le vide le précipité imbibé d'alcool. La poudre sèche ainsi obtenue représente 10 % de la tuberculine employée. L'alcool en retient encore une partie, puisque le résidu glycériné, qui reste après l'évaporation, peut tuer un cobaye tuberculeux à la dose de 1 centimètre cube et demi.

Peu satisfait des résultats fournis par ce moyen simple, il est vrai, mais un peu grossier, M. Koch s'adjoignit MM. Brieger et Proskauer pour essayer des traitements par le sulfate d'ammoniaque, l'acide phosphomolybdique, le tannin, etc.; enfin par tous les réactifs que les chimistes emploient dans ce genre de travaux. Le succès ne fut pas beaucoup plus grand; on parvenait bien à précipiter toute la tuberculine par le tannin par exemple, mais ce n'était pas là une purification, car on condense ainsi avec la tuberculine les impuretés qui l'accompagnent et le tannin en plus.

M. Koch en revint donc à l'emploi de l'alcool, mais cette fois de l'alcool faible. La tuberculine, mélangée à 2 ou 3 fois son volume d'alcool, donne un précipité blanc floconneux qui se dépose bien. On le lave par décantation avec de l'alcool à 50 ou 60 % jusqu'à ce que celui-ci ne se colore plus, puis par l'alcool absolu, et on sèche à 100°. Le produit a l'aspect d'une poudre légèrement teintée de gris; il est bien supérieur en activité à toutes les substances obtenues par les autres procédés. 10 milligrammes de cette matière produisent le même effet que 5 décigrammes de tuberculine brute et que 50 milligrammes du précipité produit par l'alcool absolu. Quelquefois même, 5 milligrammes et 2 milligrammes suffisent à tuer un cobaye. Le rendement représente 1 % de la tuberculine employée; si on fait usage d'alcool plus fort, le rendement augmente, mais le précipité est plus impur. On perd ainsi la moitié de la tuberculine qui reste dans l'alcool de lavage.

Cette tuberculine purifiée est soluble dans l'eau; elle s'altère rapidement en solution aqueuse, surtout à chaud; elle devient en partie insoluble si on évapore au bain-marie. Au contraire, les solutions dans la glycérine à 50 0/0, les solutions dans l'eau additionnée de quelques centièmes de glycérine sont très stables, même au-dessus de 100°.

La tuberculine purifiée ne précipite pas quand on la verse dans l'alcool absolu, celui-ci devient seulement opalescent. Mais la précipitation se produit aussitôt si on ajoute un sel, du sel marin par exemple. C'est donc à cause de la présence des sels que la tuberculine brute précipite par l'alcool. Cette solubilité dans l'alcool entraînerait une perte, lorsque dans la préparation on fait les lavages à l'alcool; pour l'éviter, il suffit d'ajouter un peu de chlorure de sodium, dès que l'alcool est opalescent.

M. Koch fait connaître ensuite l'action des réactifs usuels sur les solutions de tuberculine. Elle donne ces réactions des matières albuminoïdes, précipite par l'acide acétique, l'acide picrique, etc.; mais toutes ces réactions ne peuvent caractériser la tuberculine, elles sont communes à bien d'autres substances.

Pour M. Koch, le précipité préparé à l'aide de l'alcool à 60 0/0 « représente la substance active dans sa pureté presque absolue, peut-être même constitue-t-il le principe actif complètement isolé». Aussi, n'a-t-il pas hésité à le confier à MM. Brieger et Proskauer pour en faire l'analyse élémentaire. Ces chimistes ont trouvé d'abord que la substance contenait de 16 à 20 0/0 de cendres. Cette simple constatation aurait pu les dispenser d'aller plus loin, elle suffisait à prouver que la matière isolée était loin d'être pure, et que par conséquent toute analyse élémentaire était superflue. Néanmoins, MM. Brieger et Proskauer ont dosé le carbone (47,02 à 48,13 0/0), l'hydrogène (7,06 à 7,55 0/0), l'azote 14,45 à 14,73 0/0) et le soufre (1,14 à 1,17 0/0).

La conclusion de toute cette étude chimique, qui contient des détails intéressants, ne pouvait pas être bien nette et, en effet, elle ne l'est guère. Pour M. Koch, la tuberculine « semble être très voisine des albuminoïdes, elle s'en distingue cependant. Ainsi, elle se sépare des toxalbumines par sa résistance à la chaleur et de la peptone par sa précipitation en présence de l'acétate de fer ». Ce n'est pas beaucoup nous renseigner sur la tuberculine que nous dire qu'elle est différente des toxalbumines que nous ne connaissons pas du tout, ni avancer beaucoup nos connaissances sur les produits des bactéries pathogènes en général, que d'ajouter « qu'il n'est pas invraisemblable qu'il y en a parmi eux d'analogues à la tuberculine et qui, joints à elles, pourront constituer un groupe spécial de matières albuminoïdes ». Pour nous, après la lecture de cette partie du travail de M. Koch, nous inclinerions plutôt à penser que la tuberculine purifiée ressemble aux tox

en ce que, comme elles, elle est constituée par beaucoup de substance albuminoïde mélangée à une très petite quantité d'une matière active, spécifique, et dont la nature nous est tout à fait inconnue.

Mais, ce qui est plus intéressant encore que la composition centésimale de la tuberculine purifiée, c'est son action sur l'homme. La tuberculine purifiée est-elle dépourvue des inconvénients de la tuberculine brute? Représente-t-elle la substance curative débarrassée des matières nuisibles? M. Koch l'a d'abord essayée sur l'homme sain; à la dose de 2 à 5 milligrammes, elle produit une élévation de température, une augmentation dans la fréquence du pouls, des tiraillements dans les muscles, et même dans un cas (avec 5 milligr.) elle a causé du frisson, des nausées, des vomissements, de la céphalalgie et de l'insomnie. Un produit d'une semblable activité sur les personnes saines ne pouvait être administré qu'avec une grande prudence aux tuberculeux. Des malades de l'hôpital Moabit ont reçu, pendant quelques mois, soit exclusivement de la tuberculine pure, soit alternativement de la tuberculine pure et de la tuberculine brute. M. Koch se borne à résumer le résultat de ses expériences en une phrase : « Ici encore, la tuberculine pure ne se différencie pas de la tuberculine brute [1]. » C'est dire beaucoup en peu de mots.

Nous n'avons donc rien gagné à la purification de la tuberculine; son pouvoir toxique grandit, mais non son effet thérapeutique, à mesure que sa pureté augmente. C'est une espérance qui nous échappe, car ce n'est pas ce résultat que nous attendions, après les paroles pleines de promesse que M. Ehrlich a fait entendre au Congrès de Londres, au mois d'août dernier. Il nous avait fait entrevoir que la tuberculine purifiée jouissait d'une grande activité curatrice sans conserver de propriétés nocives. En présence des conclusions si peu encourageantes de M. Koch, il faut en rabattre, et reconnaître que nous sommes loin du but que l'on nous disait près d'être atteint.

M. Koch pense cependant qu'il faut persister dans cette voie, et que l'on trouvera peut-être des procédés de purification meilleurs que ceux qu'il emploie. Par d'autres méthodes, MM. Klebs et Hunter auraient obtenu, chacun de leur côté, une tuberculine plus efficace et moins dangereuse; il n'est pas encore possible de porter un jugement sur les travaux de ces auteurs, mais on peut dire que les procédés de précipitation fractionnée et de dialyse mis en œuvre par M. Hunter paraissent plus délicats que le moyen un peu grossier de la précipitation par l'alcool auquel M. Koch a eu recours.

1. La première a la même valeur diagnostique et thérapeutique qu e la
Le produit pur ne présente même pas d'avantages pour ce qui est du dosage ou de la conservation.

En résumé, toute cette étude qui avait pour but la découverte d'un produit thérapeutique non nuisible a abouti à la préparation d'une substance plus toxique, mais pas plus curatrice que celle dont on était parti.

II

La deuxième partie de la communication est consacrée à la préparation de la tuberculine brute telle que la vend M. Libbertz. Le procédé pour l'obtenir est très simple : il suffit de cultiver le bacille de la tuberculose dans du bouillon de veau glycériné à 4 0/0 et additionné de 1 0/0 de peptone. Il faut faire l'ensemencement à la surface du liquide en y déposant avec précaution, pour ne pas les immerger, ces plaques de bacilles tuberculeux qui flottent sur les cultures quand on ne les agite pas. Le développement se fait en voile et est plus rapide. Après 6 à 8 semaines, on évapore la culture totale au bain-marie d'eau bouillante jusqu'au 1/10e du volume, et on filtre le liquide à la bougie de porcelaine. M. Koch déclare qu'il faut être très exercé pour faire ces cultures en liquide et les conserver à l'état de pureté.

Ces recommandations paraîtront exagérées, car en réalité rien n'est plus simple que de faire des cultures pures de tuberculose en bouillon glycériné. Leur aspect est caractéristique et le contrôle de la pureté très facile. Mais, M. Koch a soutenu si longtemps qu'il était presque impossible d'obtenir des cultures pures en milieux liquides qu'il devait à ses anciennes opinions d'insister sur ces prétendues difficultés.

C'est un sensible plaisir pour nous d'apprendre que le savant directeur de l'Institut pour les maladies infectieuses a adopté, sans y rien changer, pour la préparation de la tuberculine, le milieu glycériné que nous avons proposé autrefois, M. Nocard et moi. L'origine du bacille n'a pas d'importance; les résultats sont les mêmes, qu'il vienne de l'homme ou des animaux. Nous pouvons ajouter que, dans les expériences que nous avons faites avec M. Metchnikoff, nous avons reconnu qu'il y avait avantage, pour préparer la tuberculine, à se servir des bacilles de la tuberculose aviaire. Ils croissent plus vite, et ont une aptitude particulière à se développer en voile à la surface du liquide. La pellicule se forme bien plus rapidement qu'avec le bacille ordinaire : elle couvre bientôt toute la surface libre en grimpant un peu sur la paroi des vases. Les microbes étalés ainsi au large contact de l'air élaborent leurs produits en un temps plus court. Pour activer encore la formation de tuberculine, nous faisons la culture dans des

vases à fond très plat et très large, de façon que la couche de liquide soit peu épaisse et que la culture occupe une surface étendue. De plus, les bacilles aviaires sont moins sensibles aux variations de la température et aux changements dans la composition du milieu. Ils nous paraissent préférables pour la fabrication en grand de la tuberculine. Nous nous sommes assurés à maintes reprises que le produit qu'ils donnent à la même activité que celui fourni par le bacille de la tuberculose de l'homme. La filtration à la bougie est, croyons-nous, une complication inutile ; nous nous sommes contentés de filtrer sur papier de façon à avoir un liquide clair. Les rares bacilles qui pourraient passer dans la liqueur ont été sûrement tués par la chaleur. D'ailleurs nous chauffons la culture à l'autoclave avant de l'évaporer.

Il n'y a donc, dans la préparation de la tuberculine, aucune difficulté, et on se demande pourquoi M. Koch a mis si longtemps à la divulguer? Au début, on justifiait le silence de l'inventeur en disant que le procédé qu'il employait demandait tant de soins, qu'il était nécessaire de le tenir secret, de peur qu'on ne fabriquât ailleurs de mauvaises tuberculines. M. le ministre Von Gossler déclarait à la Chambre des députés de Prusse, que, d'après M. Koch, il faudrait, pour préparer la tuberculine, six mois de travail à un expérimentateur habile qui viendrait à en découvrir le secret.

Il est vrai qu'aujourd'hui M. Koch reconnaît que tout bactériologiste qui sait son métier, peut faire en six semaines autant de tuberculine qu'il en veut. Mais quand on se rappelle les déclarations faites il y a un an, on ne s'explique pas la sévère admonestation que M. Koch adresse aux bactériologistes en général, avant de leur indiquer son procédé. « Dans ma dernière publication sur la tuberculine, écrit M. Koch, j'ai donné sur son origine et sa préparation assez d'indications pour qu'un homme du métier puisse suivre la voie que j'ai montrée. Les indications que la tuberculine est contenue dans les cultures du bacille de la tuberculose et que l'on peut toujours s'assurer de sa présence par l'essai sur le cobaye tuberculeux, le fait que la réaction de l'animal donne toujours un moyen de contrôle, auraient dû suffire à un bactériologiste habile pour le mettre à même de préparer la tuberculine ou un produit équivalent. Si, malgré cela, un très petit nombre de bactériologistes ont eu le courage de se risquer dans cette recherche et, autant que j'en pouvais juger, par la bibliographie d'ailleurs si étendue sur ce sujet, ne sont arrivés qu'à une solution approchée du problème, cela a pour les bactériologistes actuels quelque chose de honteux. Au lieu d'expérimenter avec indépendance, ils demandent à cor et à cris une recette pour fabriquer la tuberculine. »

Si donc M. Koch ne s'est pas tout d'abord complètement expliqué sur la préparation de la tuberculine, c'est qu'il voulait éprouver la

sagacité et l'esprit d'initiative des microbiologistes. En maître bactériologue qu'il est, il a posé une tâche à des élèves et il les réprimande aujourd'hui de leur peu de zèle. Mais il nous semble pourtant que nous n'avons pas tous les torts, que M. Koch n'a pas lieu d'être si mécontent de la façon dont a été étudié le problème qu'il avait posé, et que c'est injustement qu'il nous châtie. Il suffit pour s'en convaincre de rappeler les faits. Dès le lendemain de l'annonce de la guérison de la tuberculose, alors qu'aucun éclaircissement n'avait été donné sur la méthode, et que l'on disait partout en Allemagne qu'elle reposait sur des principes entièrement nouveaux qui ne pouvaient manquer de s'appliquer à nombre de maladies, M. Buchner, M. Charrin[1] écrivaient qu'il était très probable que la tuberculine provenait des cultures du bacille tuberculeux, que M. Koch avait sans doute suivi la voie déjà ouverte depuis quelques années, et qui a conduit à rechercher, dans les produits microbiens, des substances vaccinantes et thérapeutiques. Avant même que M. Koch eût indiqué que la tuberculine était l'extrait glycériné des cultures, plusieurs bactériologistes avaient reconnu, dans les premiers échantillons de tuberculine, l'odeur et les propriétés de l'extrait des cultures tuberculeuses[2]. La tuberculine était bientôt préparée par MM. Hueppe et Scholl[3], qui indiquaient qu'il fallait s'adresser aux cultures en milieux liquides, et les évaporer sans addition de glycérine. M. Bujwid, M. Babès, M. Crookshank ont aussi obtenu, il y a des mois déjà, une tuberculine dont les effets étaient comparables à celle que vend M. Libbertz. Avec M. Metchnikoff nous avons extrait, des cultures de tuberculose humaine et aviaire, de la tuberculine que nous pouvions montrer dès le commencement de cette année aux nombreux savants qui fréquentent l'Institut Pasteur. Le Dr Quinquaud a fait l'essai de cette tuberculine dans son service de l'hôpital Saint-Louis, sur des lupiques qui ont réagi comme avec la tuberculose allemande. Au mois d'août, nous pouvions présenter de nombreux échantillons de tuberculines d'origine diverses, aux membres du Congrès de la tuberculose qui ont visité l'Institut Pasteur. M. Nocard a éprouvé notre tuberculine sur les vaches phtisiques; on connaît le résultat de ses observations communiquées à l'Académie de médecine.

Il est donc injuste de dire que les bactériologistes n'ont pas eu le courage d'aller de l'avant et que, pour faire de la tuberculine, ils aient attendu servilement une ordonnance. La vérité est qu'ils savaient préparer la tuberculine avant la dernière communication de M. Koch,

1. *Munch. Med. Woch.*, et *Bulletin médical.*
2. Voir la Revue de M. Metchnikoff sur la tuberculine, dans ces *Annales*, t. V, p. 185.
3. *Berl. Klin. Wochen.*, 1891, nos 4 et 8.

et, sur ce point, celle-ci ne leur a rien appris. Aujourd'hui, elle vient trop tard; il y a un an, ils l'auraient reçue avec reconnaissance.

Cette quatrième note de M. Koch a cependant rendu un grand service aux microbiologistes, elle les a délivrés d'une incertitude. Ceux qui travaillaient sur le sujet ignoraient si leurs expériences pourraient être comparées à celles de M. Koch. Ils avaient bien préparé des tuberculines qui donnaient sur le cobaye tuberculeux les réactions caractéristiques, mais ils ne parvenaient point à donner à ces animaux l'immunité contre la tuberculose dont M. Koch a parlé. Ils se demandaient alors si leurs produits ne différaient pas par quelque point de celui qu'emploie le savant professeur de Berlin. On pouvait supposer, par exemple, que M. Koch se servait d'un milieu de culture spécial [1], ou encore qu'il ensemençait un bacille d'une virulence particulière, et que là était la raison de la différence entre les résultats. Aujourd'hui les bactériologistes sont fixés sur ce point, leur tuberculine est la même que celle de M. Koch, et leurs expériences ont toute leur valeur. Délivrés de cette incertitude, ils pourront expérimenter sur la tuberculine avec une nouvelle ardeur. Il leur reste, toutefois, encore une inquiétude : en se servant de la tuberculine de M. Libbertz, ils n'ont point guéri les cobayes tuberculeux. C'est sans doute parce qu'ils ne l'emploient pas selon la méthode de M. Koch. Aussi émettent-ils un vœu, c'est que M. Koch achève de faire la lumière en donnant, dans tous leurs détails, ses expériences sur la guérison des cobayes tuberculeux, expériences qui l'ont autorisé à agir sur l'homme Cette publication est nécessaire; elle ne peut plus être retardée.

E. Roux.

E. Pfuhl. Contribution au traitement des cobayes tuberculeux avec la tuberculine de Koch (*Zeitschrift fur Hygiene und Infectionskrankheiten*, t. 11, n° 2, 1891, p. 241).

Comme cela est suffisamment bien connu, la base fondamentale de la théorie de M. R. Koch sur le traitement de la tuberculose par sa tuberculine consiste en un effet curatif très efficace de cette substance sur le cobaye, animal le plus sensible à la tuberculose humaine. Ce fait, annoncé d'abord au Congrès international de Berlin, a été ensuite répété par M. Koch dans sa note mémorable du 13 novembre 1890.

Mais, malgré l'importance tout à fait extraordinaire de cette décou-

1. C'est ainsi que le bacille de la tuberculose croît avec une vigueur particulière dans des bouillons glycérinés additionnés de fécule et convertis en un empois peu consistant

verte, M. Koch n'a pas voulu fournir de données plus précises sur ses expériences avec les cobayes traités et guéris par la tuberculine. Même dans sa dernière (quatrième) communication, où il expose les détails de ses tentatives pour purifier la tuberculine ainsi que le procédé pour obtenir cette substance, il garde sur la question la plus importante, — la guérison des cobayes, — le même profond silence. Et cela, malgré l'insistance énergique de nombreux savants, entre autres de MM. Bergmann[1] et C. Frankel[2], qui comptent parmi les adeptes du grand bactériologiste allemand.

Et cependant l'urgence d'une publication plus précise était d'autant grande que plusieurs savants, comme MM. Jaccoud, Dujardin-Beaumetz et Dubief, Baumgarten[3], Grawitz, Bardach et autres, n'avaient obtenu que des résultats défavorables dans le traitement de plusieurs espèces animales (lapin, singe, spermophile), et entre autres avec le cobaye.

On comprendra facilement, dans ces circonstances, la haute importance de la publication susmentionnée de M. Pfuhl, dont l'intérêt s'accroît encore par le fait que ce savant a été un des collaborateurs de M. Koch dans la préparation de la tuberculine, ainsi que dans le traitement de la tuberculose[4]. Aussi le travail de M. Pfuhl, dont nous voulons rendre compte, a été exécuté dans le laboratoire de M. Koch.

Voici les principaux résultats obtenus par M. Pfuhl :

« 1° Le traitement (des cobayes) avec de faibles doses de tuberculine seule, ou avec une combinaison de semblables doses avec le calomel, le sublimé, l'or, l'argent, l'arsenic, la créosote et le benzoate de soude, ne produit aucun effet marqué ;

« 2° *On obtient au contraire un effet très favorable lorsqu'on monte jusqu'à des fortes doses, en continuant le traitement avec ces dernières ;*

« 3° La résorption des altérations tuberculeuses ne se produit probablement que dans les cas où la tuberculine provoque une réaction locale. »

Nous nous arrêterons surtout sur le second point, à cause de son importance de beaucoup la plus grande.

Le traitement des cobayes (inoculés depuis 6 à 8 semaines) avec des fortes doses, a été commencé avec 0,001 — 0,002cc pour atteindre

1. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1891, p. 490.
2. *Hygienische Rundschau*, 1891, p. 468.
3. Tout récemment M. Doenitz (*Deutsch. med. Woch.*, 1891, p. 1289), dans un travail fait au laboratoire de M. Koch, a trouvé, contrairement à l'assertion de M. Baumgarten, que la tuberculine guérit la tuberculose expérimentale de l'œil des lapins. Mais on ne peut rien conclure des données de M. Dœnitz, au sujet de l'efficacité du traitement pour empêcher la généralisation de la tuberculose. Comme cela a été constaté souvent pour le lapin, et la tuberculose des cobayes, une améliorations locale, sous l'influence de la tuberculine, n'empêche point la marche progressive de la maladie.
4. *Deutsche medicin. Wochenschr.*, 1890, n° 46, A.

des doses plus élevées, allant jusqu'à 0,1cc. Trois cobayes, traités de cette façon, moururent 9 1/2, 9 1/2 et 12 semaines après l'inoculation sous-cutanée d'une culture de bacilles tuberculeux. Ce résultat doit être considéré comme nul, parce que les témoins de M. Pfuhl, inoculés de la même façon, mais laissés sans aucun traitement, mouraient 6 à 11 semaines après l'inoculation.

Trois autres cobayes, dont le traitement a été commencé 4 jours, 3 et 4 semaines après l'inoculation, avec des doses allant jusqu'à 0,6cc, sont restés vivants jusqu'à la date de la rédaction de l'article de M. Pfuhl (30 octobre dernier), et ne peuvent point être considérés comme guéris, puisque ces cobayes n'ont été inoculés avec la culture des bacilles que 11, 15 et 16 semaines avant cette date. Tout ce qu'on peut faire, c'est d'accepter ici un certain ralentissement de la maladie sous l'influence de la tuberculine, et encore il faut tenir compte de la grande variabilité dans la sensibilité individuelle des cobayes vis-à-vis du virus tuberculeux. Déjà les sept animaux témoins de M. Pfuhl (non traités) ont montré une différence de cinq semaines dans la durée de la maladie (morts 6 à 11 semaines après l'inoculation). Si le nombre des témoins était plus grand, cette différence (comme nous pouvons l'affirmer d'après les recherches faites en commun avec M. E. Roux à l'Institut Pasteur) serait sûrement encore plus marquée.

Il reste encore le septième cobaye de M. Pfuhl, traité avec les plus fortes doses, allant jusqu'à 1cc de la tuberculine. Ce cobaye, pesant au début de l'expérience 485 grammes, et dont le traitement a été commencé 5 semaines après l'inoculation avec le virus, reçut en somme 16cc,24 de la tuberculine. Il vécut 19 semaines après l'inoculation et mourut d'une tuberculose généralisée, mais résidant surtout dans les poumons. Tandis que ces derniers étaient criblés de petits tubercules, la rate ne présentait qu'une faible hypertrophie et ne contenait, ainsi que le foie, que de légères lésions tuberculeuses. Le ganglion de l'aine, voisin de l'endroit de l'inoculation, ne présentait que le volume d'un pois caséifié dans son milieu, tandis que la plaie d'inoculation s'était complètement cicatrisée.

M. Pfuhl explique ces phénomènes par une réduction très considérable des foyers tuberculeux dans les organes abdominaux, sous l'influence du traitement. Quant aux poumons, si envahis par les bacilles, M. Pfuhl cherche à attribuer leur état peu satisfaisant au manque d'une réaction suffisante à la suite du traitement. « Pourquoi précisément chez le cobaye — dit M. Pfuhl (p. 256) — ni la réaction, ni la guérison n'atteignent point le poumon, c'est une question qui jusqu'à présent n'a pas encore été résolue... Heureusement — ajoute cet auteur — les poumons du cobaye se comportent, sous ce rapport, d'une façon différente de ceux de l'homme. »

M. Pfuhl reconnaît lui-même — malgré l'assertion contraire de M. Koch — que la tuberculine ne donne point l'immunité contre la tuberculose, ce qu'il attribue également à l'absence d'une réaction à la suite des injections. Pour appuyer cette thèse il cite le cas d'un cobaye qui a été, pendant un mois et demi, traité avec de fortes doses de tuberculine (jusqu'à 1cc) et qui, inoculé avec des bacilles, présenta la même marche de la maladie que ses témoins non traités. Et cela bien que le cobaye, après avoir été infecté par les bacilles, eût subi un traitement des plus intensifs, qui consista en injections tous les deux jours avec 1cc de tuberculine.

Même si on ne conteste pas l'interprétation des faits recueillis par M. Pfuhl, on verra facilement que sa conclusion d'un « effet très favorable » du traitement par des hautes doses n'est nullement justifiée.

Les données de M. Pfuhl sont en général très insuffisantes, parce qu'elles ne s'appuient que sur sept cobayes, dont trois doivent être exclus comme étant inoculés depuis trop peu de temps. En général la publication de son mémoire doit être considérée comme très prématurée, vu que ses expériences sur la matière n'ont été poursuivies que depuis la moitié d'avril jusqu'à la fin d'octobre 1891. Or, une période de six mois et demi pour un travail sur une maladie de si longue durée, est tout à fait insuffisante.

Les expériences sur le traitement des cobayes par la tuberculine, poursuivies par M. Émile Roux et moi, depuis onze mois, ne nous permettent point de partager l'optimisme de M. Pfuhl. Le premier cobaye qui a été traité sous nos yeux par M. Bardach à l'Institut Pasteur, et qui paraissait bien résister à la tuberculose (comme je l'ai mentionné dans ma revue sur la tuberculine, p. 187 de ces *Annales*), finit par mourir d'une tuberculose généralisée quatre mois après l'inoculation avec une culture. Et cependant cette dernière, qui est d'origine humaine, ne possède, en général, qu'une virulence médiocre, puisqu'elle tue les cobayes en 10 — 27 semaines.

Toutes nos tentatives de traitement des cobayes, inoculés avec cette culture, par la tuberculine fournie par M. Libbertz à Berlin, ainsi que par plusieurs variétés de tuberculines préparées par nous (soit avec des cultures de tuberculose aviaire, soit avec des cultures de tuberculose humaine), n'ont abouti qu'à des résultats peu encourageants. Et cependant, dans presque toutes nos expériences, nous avons eu soin de séparer les injections par des intervalles assez longs pour ne pas permettre à nos cobayes de s'accoutumer à l'action de la tuberculine. Nous avons réalisé ainsi le vœu exprimé par M. Pfuhl à la fin de son article. Considérant la réaction à la suite des injections de la tuberculine comme un élément indispensable de la guérison, cet auteur

espère obtenir de meilleurs résultats en n'appliquant le traitement qu'avec des doses séparées par plusieurs jours d'intervalle.

Nos expériences dans cette voie ne nous ont point satisfait. Après avoir acquis la conviction de l'inefficacité des faibles doses, nous nous sommes adressé aux doses plus fortes, mais espacées. De quatre cobayes, de poids à peu près égal, inoculés le 12 mai sous la peau avec un peu de la culture susmentionnée, un a été soumis au traitement par la tuberculine de M. Libbertz, préparée le 21 mars 1891; un autre au traitement par la tuberculine aviaire fraîchement préparée, tandis que deux autres cobayes ont été gardés comme témoins. Le traitement, commencé trois jours après l'inoculation du virus, a été fait avec des doses de 0,5^{cc} de tuberculine et prolongé pendant deux mois et demi. Les intervalles de plusieurs jours entre chaque injection étaient assez grands pour que la réaction à la tuberculine se manifestât chaque fois par une élévation de température de un degré et plus. La dose totale de tuberculine a été de 7^{cc},875. Quatre mois et six jours après le début de l'expérience, deux cobayes moururent, dont un témoin et un autre traité avec notre tuberculine : tous deux avaient une tuberculose généralisée. Dix jours plus tard mourut le cobaye traité par la tuberculine de M. Libbertz. L'autopsie montra que les ganglions de l'aine n'étaient pas trop grands, que la rate était faiblement hypertrophiée et criblée de tubercules, que le foie était légèrement tuberculeux, et que les poumons étaient transformés en masses tuberculeuses. Le quatrième cobaye, un témoin qui n'a été soumis à aucun traitement, vit jusqu'à présent, c'est-à-dire depuis six mois et demi. Il n'est pas encore trop maigre et respire librement, ce qui ne l'empêche point d'être tuberculeux et de présenter des ganglions énormes dans les deux aines. La plaie de l'inoculation est complètement guérie, et la peau qui revêt la cicatrice est couverte de poils.

Dans une autre expérience, nous avons commencé le traitement d'un cobaye, six jours après son inoculation avec le même virus tuberculeux, en lui injectant d'emblée 1^{cc} de la tuberculine aviaire. La réaction très violente se manifesta par une hypothermie de trois degrés, après quoi la température se releva jusqu'à la normale. La seconde dose de 1^{cc} a été injectée 12 jours plus tard et ne provoqua qu'une hyperthermie jusqu'à 41°. Une troisième injection, pratiquée dix jours plus tard, donna une élévation de température de un degré. La quatrième dose de 1^{cc}, injectée neuf jours après, a produit une hypothermie de 2°,2. On voit bien que dans ce cas ce n'est point l'absence ou la faiblesse de la réaction qui pourrait être mise en cause. Et cependant le cinquième centimètre cube, injecté huit jours après le traitement précédent, a provoqué une hypothermie, suivie du collapsus et de la mort.

A l'autopsie de ce cobaye (mort prématurément 44 jours après le début de l'expérience, alors que ses trois témoins ne manifestèrent aucun signe de maladie grave), nous avons constaté un ulcère rond de la peau à l'endroit de l'inoculation, des petits ganglions des aines, une rate très hypertrophiée et très rouge, renfermant des tubercules. Le foie, également hypérémié, présentait un nombre considérable de tubercules submiliaires, tandis que les poumons ne renfermaient que peu de tubercules. Les dernières semaines de sa vie, le cobaye était très maigre et visiblement souffrant. Cet animal, si sensible à la tuberculine, était donc intoxiqué par ce produit, et pourtant la tuberculose se généralisait d'organe en organe.

Nous ne croyons pas utile de relater ici toutes nos expériences. Ces faits, exposés brièvement, démontrent l'inefficacité de la tuberculine comme moyen curatif de la tuberculose chez les cobayes. Ce résultat confirme les données communiquées par M. Bardach au Congrès de Londres (août 1891) et se trouve en harmonie avec les faits rapportés par M. Pfuhl dans son mémoire. Comme preuve de ce qu'une survie de quelques semaines ne signifie pas encore la guérison, nous citerons non seulement le cas du cobaye non traité que nous avons mentionné, mais encore d'autres exemples analogues. Il nous est arrivé de voir un cobaye survivre pendant un an à l'inoculation du virus et après une méthode de traitement qui, en général, n'est rien moins que curative.

On voit, d'après tout ce qui a été rapporté, que la base fondamentale de l'immunisation et de la guérison par la tuberculine, l'expérimentation sur les cobayes, n'a donné que des résultats défavorables. Si l'on tient compte de l'affirmation de M. Pfuhl, à savoir que la réaction est l'élément nécessaire de la guérison, on comprendra l'inutilité de tous les efforts pour isoler de la tuberculine la substance « curative » de celle qui produit la réaction.

El. Metchnikoff.

INSTITUT PASTEUR

Personnes mortes de la rage après le traitement.

Roig Juan, 13 ans, demeurant chez son père, instituteur, à Puebla de Tiana, province de Barcelone (Espagne). Mordu le 7 septembre 1891 par un chien appartenant à son père, et abattu le même jour sans examen vétérinaire.

L'animal avait été mordu 41 jours auparavant par un chien errant, qui en avait également mordu beaucoup d'autres. Il paraissait malade depuis deux jours; sa voix était changée, devenue rauque; il mangeait les corps étrangers, et en particulier sa litière; il était devenu très agressif, et a essayé de mordre d'autres personnes.

L'enfant Roig présentait sur la joue droite 12 à 14 morsures s'étendant depuis la paupière inférieure jusqu'au milieu de la joue; plusieurs de ces morsures ont été pénétrantes. Elles n'ont pas été cautérisées.

Il a subi le traitement à l'Institut Pasteur du 12 septembre au 2 octobre. Le 10 octobre, il ressent les premiers symptômes de la rage; la mort survient le 12 octobre.

Carry Louis, 13 ans, demeurant à Lyon, mordu le 11 septembre 1891, par un chien reconnu enragé, à l'observation et à l'autopsie, par l'École vétérinaire de Lyon.

L'enfant Carry porte à la partie moyenne de l'avant-bras gauche deux morsures ayant saigné et dont les cicatrices sont encore visibles 13 jours après; le bras était nu au moment de l'accident; on n'a fait aucune cautérisation.

Carry se présente aux inoculations le 24 septembre (13 jours après l'époque des morsures); il subit un traitement jusqu'au 8 octobre. Le 25 octobre, il est pris de vomissements; les jours suivants, les symptômes rabiques se déclarent et sont constatés par les docteurs Lacroix et Musy; la mort survient le 29 octobre (Rapport de M. le docteur Roux, directeur du Bureau d'hygiène de Lyon).

Une autre enfant, mordue également le 11 septembre par le même chien, a été traitée à l'Institut Pasteur, du 16 septembre au 3 octobre; elle est actuellement en bonne santé. Elle s'était présentée au traitement cinq jours seulement après la morsure.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — OCTOBRE 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	4	5	»	1	6	»		1
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	1		»	5		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	2	»	»	2	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	4	»	»	1	»	»
Morsures aux mains { simples	»	5	23	»	17	39	»	6	9
Morsures aux mains { multiples	»	18		»	22		»	3	
Cautérisations efficaces	»	»	»	4	»	»	2	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	15	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	15	»	»	20	»	»	5	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	7	12	»	9	21	»	3	4
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	5		»	12		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	10	»	»	12	»	»	3	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	8	»	»	1	»	»
Habits déchirés	11	»	»	18	»	»	4	»	»
Morsures à nu	1	»	»	3	»	»	»	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	2	2		1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	2	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Habits déchirés	1	»	»	1	»	»	1	»	»
Morsures à nu	1	»	»	2	»	»	1	»	»
Totaux. { Français et Algériens		37	41		60	68		15	15
Totaux. { Etrangers		4			8			»	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					124				

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 115 fois; chats, 7 fois; vaches, 2 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

5me ANNÉE. DÉCEMBRE 1891. N° 12.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

FONCTIONS ET RACES DU BACILLE CYANOGÈNE

(MICROBE DU LAIT BLEU)

PAR M. C. GESSARD.

(Travail du laboratoire de chimie biologique à l'Institut Pasteur.)

J'ai été conduit à m'occuper du bacille du lait bleu, en poursuivant l'étude des fonctions microbiennes au point de vue de la production des pigments. Les travaux dont ce microbe a été l'objet pouvaient faire penser qu'il ne produit pas qu'un seul pigment : je me suis proposé d'éclaircir ce point. On a signalé de la fluorescence dans ses cultures : il était intéressant de comparer cette fluorescence à celle qu'offrent d'autres espèces. Mes études antérieures sur le bacille pyocyanique m'ont bien servi pour aborder ces questions. J'ai trouvé, en effet, des analogies nombreuses entre les deux bacilles, dans les changements qu'impriment à la fonction chromogène les variations de race et de milieu. Des moyens analogues à ceux dont je m'étais déjà servi m'ont aidé à obtenir ces variations. D'un autre côté, j'ai pu reproduire, en culture pure, dans le lait, l'aspect et l'intensité de coloration qui n'appartenaient jusqu'ici qu'au phénomène naturel. L'exposé de ces résultats est l'objet de ce mémoire.

I

Il faut rappeler d'abord sous quel aspect et dans quelles conditions apparaît spontanément le bleuissement du lait, pour marquer le but proposé aux recherches expérimentales et voir jusqu'à quel point elles l'ont reproduit, et pour apprécier, dans la seconde partie de ce travail, en quelle mesure est adéquate aux faits l'idée que les auteurs ont conçue du déterminisme du phénomène. On ne saurait mieux faire ici que de reproduire la description de M. Reiset, qui a observé plusieurs fois cette altération du lait dans sa laiterie.

« La moisissure bleue, à la surface de la crème, se présente sous les formes et les aspects les plus variés : souvent une bande bleue frangée, de $0^m,010$ à $0^m,020$ de largeur, se développe en cercle contre les parois du vase ; quelques taches isolées peuvent se trouver vers le centre ; plus souvent encore, après quarante ou soixante heures de séjour à l'air, l'aspect de la crème serait assez bien figuré par la coupe d'un savon de Marseille fortement veiné de bleu, car la coloration bleue est aussi intense que celle de l'indigo ou du bleu de Prusse ; parfois la crème apparaît comme saupoudrée avec une poussière d'indigo, à grains de grosseurs diverses. Dans certains cas, les points bleus restent sans développement ; parfois, au contraire, ces points se développent rapidement ; de proche en proche, ils deviennent confluents ; en quelques heures l'envahissement est complet et la pellicule bleue recouvre, alors, toute la surface de la crème [1]. » M. Reiset insiste encore sur la réaction très nettement acide que présentait toujours le lait, sur l'aspect luisant des taches bleues. Enfin, « tandis que la crème conserve sa couleur jaune normale, au-dessous de la pellicule bleue, le sérum et le caséum sont le plus souvent fortement colorés en bleu, si les taches se présentent nombreuses ».

La réaction caractéristique de la matière colorante du lait bleu est connue depuis Braconnot : « Elle n'est point affectée par les acides ; elle passe au rouge vif par les alcalis et reprend sa nuance azurée primitive par le moyen d'un acide » [2].

1. Observations sur le lait bleu. *Comptes rendus, Académie des sciences*, t. XCVI, 1883.
2. Observations sur le lait bleu. *Journal de Chimie médicale*, 2e série, t. II, 1839.

Pour l'étude microbienne du lait bleu, le mémoire de M. Neelsen [1] a fait justement époque. Le rôle du microbe, pressenti par différents auteurs, y est démontré par la réapparition de la même couleur bleue dans une solution nourricière au lactate d'ammoniaque, ensemencée avec les germes d'un lait bleu. On a pu reprocher à la technique de M. Neelsen de n'assurer ni la pureté du germe, ni la stérilité du milieu. Ce savant aboutit, en effet, à la conclusion erronée que le bacille est, à lui seul, en état de produire, dans le lait, le bleu au même degré d'intensité que dans les conditions naturelles, et qu'il est, en même temps, la cause de l'acidité qui accompagne toujours le pigment. Pour M. Neelsen, la formation de la couleur bleue dépend même de cette production d'acide.

C'est M. Hueppe [2] qui a isolé sur gélatine le microbe à l'état de pureté. Il a reconnu que ce germe pur, dans le lait stérilisé, ne produit pas la belle couleur bleue que présente le lait spontanément bleui. C'est seulement une couleur grise ou gris bleu, qui devient plus bleue par addition d'acide. Le lait devient faiblement alcalin. L'acidité du lait, dans les expériences de Neelsen comme dans le phénomène spontané, est due aux organismes de la fermentation lactique. Dans les milieux où le bleu ne prend pas naissance, le microbe produit encore une couleur, verte le plus souvent.

Il donne, en gélatine-bouillon, une fluorescence verte, d'après les travaux de MM. Scholl [3] et Heim [4], qui confirment, d'ailleurs, les résultats de M. Hueppe. Ces auteurs insistent, en outre, sur la diminution et la perte du pouvoir chromogène sous l'influence du temps, et de divers agents physiques et chimiques.

Je reviendrai à plusieurs reprises sur ces travaux. Je me suis

1. Études sur le lait bleu. *Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, t. III, 1880, On trouvera dans ce travail la bibliographie du sujet, avant Neelsen.

2. Recherches sur les décompositions du lait par les microorganismes. — Organismes du lait bleu. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, t. II, 1884.

3. Contributions à la connaissance des décompositions du lait par les microorganismes. Sur le lait bleu. *Fortschritte der Medicin*, 1889, n° 21.

4. Recherches sur le lait bleu. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, t. V, 1889.

borné à en indiquer les résultats principaux. Ils sont faciles à vérifier. J'ai employé, à cet effet et pour la suite de mes expériences, un germe d'une culture qui m'a été remise par M. Duclaux et qui venait de chez M. Hueppe.

J'ai semé d'abord ce germe dans le bouillon. C'est le milieu qui, à raison de sa composition complexe, fournit aux fonctions les plus diverses des microbes, et qui peut donner lieu, par suite, au plus grand nombre d'observations intéressantes. On sait notamment que les microbes producteurs de fluorescence s'y trouvent dans des conditions favorables à la manifestation de ce phénomène. Le bacille cyanogène s'y comporte comme les autres. Toutefois la fluorescence, qu'on observe au bout de quarante-huit heures dans ses cultures, est d'un vert plus sombre que dans les cultures du bacille pyocyanique. Il convenait dès lors de l'éprouver dans le milieu que j'ai donné comme le mieux approprié à la production de la fluorescence. C'est, je le rappelle, l'albumine, telle qu'on l'extrait de l'œuf. Cette albumine, ensemencée avec quelques gouttes de la culture en bouillon, a pris, en peu de temps, une couleur verte, avec une fluorescence égale en éclat et en intensité à celle qu'offre la culture du bacille pyocyanique dans le même milieu. Pour compléter le rapprochement, cette couleur verte fluorescente passe au brun feuille-morte en vieillissant, et disparaît entièrement sous l'action des acides. Cette dernière propriété peut être utilisée pour révéler, dans le bouillon, la présence d'un pigment bleu que la fluorescence y masque en partie et qui assombrit cette fluorescence. Avec le bacille pyocyanique, le chloroforme a servi à séparer ce pigment bleu. Celui du bacille cyanogène est insoluble dans ce réactif et on ne lui connaît pas de dissolvant approprié. On pourrait donc être embarrassé, faute de connaître la nature de ce pigment. Mais, avec quelques gouttes d'acide acétique, la fluorescence verte est abolie. La couleur qui reste est un gris, ou gris bleu, dont la teinte bleue s'accentue au bout de quelques instants. On reconnaît là le pigment que les auteurs ont signalé dans les cultures du bacille cyanogène en lait stérilisé, et sa propriété de bleuir par les acides. Dès lors, le milieu est tout trouvé pour l'obtenir sans mélange de fluorescence. L'albumine, d'une part, le lait, d'autre part, offrent, à l'état isolé,

chacun des pigments qui se trouvent réunis dans le bouillon, et on vérifie de la sorte la double fonction pigmentaire du bacille cyanogène.

Cette dissociation des deux fonctions, une fois obtenue dans un germe unique, sous l'influence des variations de milieu, on doit se proposer, comme contrôle, de la réaliser dans des germes distincts. Ces germes, s'ils se comportent comme ceux du bacille pyocyanique, pourront dériver, par quelque artifice, du premier germe. Ils devront ne retenir, de cette origine commune, chacun qu'une fonction, et ne faire, par suite, apparaître qu'un des pigments, dans les conditions même où les deux prenaient d'abord naissance, c'est-à-dire par ensemencement dans le bouillon. A l'inverse de la première, cette seconde série d'expériences doit opposer l'unité du milieu aux variations du germe. Ces germes modifiés, transmettant le caractère qui les distingue à leur descendance, constitueront autant de races.

Il existe en effet une race qui ne produit dans le bouillon que le pigment gris. Je l'ai obtenue, comme la race correspondante du bacille pyocyanique, à la suite de cultures dans l'albumine. Il a suffi de deux passages dans ce milieu pour dépouiller le germe de sa fonction fluorescigène. Le pigment gris, qui bleuit par les acides, devient rouge par les alcalis. Les cultures en bouillon, vieilles et devenues fortement alcalines, sont ainsi d'un rouge sale. C'est la même réaction qui fait apparaître, après quelques jours, un fond rougeâtre, sous la fluorescence des cultures en bouillon du germe producteur des deux pigments.

Une autre race ne fait que de la fluorescence. C'est la fonction la plus durable dans le bouillon, comme on a déjà vu avec le bacille pyocyanique. On l'obtient en puisant dans une vieille culture, en bouillon ou en gélatine-bouillon, du bacille primitif. Je n'ai plus eu que cette race par ensemencement dans le bouillon, après quelques mois de culture de la semence M. Hueppe, qui m'avait antérieurement fourni l'échantillon de la race complète.

Une troisième race, dépourvue de toute fonction chromogène, est l'aboutissant de la dégradation progressive, dont les deux précédentes marquent les étapes, et se trouve à la limite extrême de la vitalité des germes. On l'obtient, en effet, par le vieillissement prolongé des cultures précédentes, ou par leur chauffage

à un degré immédiatement voisin de la température qui amène la mort du microbe.

Les cultures sur gélatine des différentes races donnent les mêmes couleurs que dans le bouillon. Les colonies, non liquéfiantes, s'entourent d'une zone teintée en vert sombre, ou en vert clair pour les races fluorescentes. La race chromogène sans fluorescence présente d'abord l'aspect violet rougeâtre, dû à la prompte transformation du pigment, diffusé dans la gélatine alcaline en contact étendu avec l'air. Certains bouillons m'ont offert aussi rapidement le ton rougeâtre, sans laisser paraître la phase grise de transition.

Trois races sont ainsi dérivées du bacille qu'on peut dire normal ou de la race type, du bacille cyanogène de Hueppe. Cette communauté d'origine, mise en regard des différences d'action que présentent ces races, peut bien étonner. Je dois prévenir les doutes qu'elle pourrait faire naître chez ceux qui n'ont pas assisté à l'évolution rétrograde que j'ai décrite. Il faut, pour cela, savoir caractériser nettement l'identité de l'espèce sous ces attributs si divers, également dépourvus de valeur spécifique. Le meilleur moyen est d'amener ces différentes races à produire, ce qu'on n'a pas obtenu jusqu'ici, même avec la plus parfaite, la belle couleur bleue qu'on observe dans le phénomène naturel du lait bleu, sans rien sacrifier, pour ce résultat, de la rigueur de la méthode microbienne.

Car il n'est pas admissible qu'on soit réduit, pour reproduire ce phénomène, au procédé que préconise encore M. Heim, cinq ans après que Hueppe a isolé le bacille. Il faut introduire du lait non stérilisé dans un récipient qui a contenu une culture pure du bacille et, après bleuissement, le remplacer par de nouveau lait. Était-ce vraiment la peine d'isoler, à l'état de pureté, le bacille cyanogène, pour le ramener aux conditions premières de son apparition, l'exposer de nouveau au conflit d'espèces rivales, et subordonner le succès de l'expérience à un équilibre favorable dans le développement des germes en concurrence? Aussi M. Heim, en renouvelant de cette façon le contenu d'un vase, a vu deux fois de suite la couleur bleue limitée à une zone au contact des parois du vase, pour s'étendre de nouveau à toute la surface du lait, dans un troisième remplissage. M. Heim trouve là un exemple de la possibilité d'une disparition temporaire et

de la réapparition du phénomène, que l'on a souvent observée dans les laiteries. On peut d'autant moins contredire cette assertion que, à part l'introduction voulue des germes cyanogènes, l'expérience est abandonnée aux chances variables d'apparition du phénomène spontané. Il faut conclure surtout de cette expérience que l'expérimentateur ne s'est pas rendu maître du déterminisme du phénomène, au point de le reproduire à son gré. On ne fait, en opérant ainsi, que recourir à la collaboration du ferment lactique, mais on ne gouverne pas son action. On sait combien elle est nécessaire, depuis Neelsen. S'il se méprenait sur l'origine de l'acide, qu'il attribuait au bacille cyanogène lui-même, cet auteur a bien observé le sens de son intervention et les limites dans lesquelles elle est utile, et il y a profit à étudier le phénomène avec lui, pour en bien comprendre la marche et arriver à le reproduire expérimentalement.

« Le lait n'est propre à prendre et à développer le contage que pendant le temps qui précède sa complète coagulation. Les ensemencements, après coagulation complète, ne donnent pas de bleu ; et même, ceux faits avant le début de la coagulation ne donnent un beau pigment que si les bactéries ont encore assez de temps pour se répandre dans le lait et produire une génération chromogène, avant que la coagulation survienne et mette un terme à leur action... Plus la coagulation du lait est lente, plus le lait a de chances de bleuir... Un lait est d'autant plus propre à l'ensemencement qu'il est plus fraîchement trait et que sa réaction est plus alcaline au moment de la traite... La coloration bleue du lait dépend de la formation d'acide lactique. Elle apparaît quand un certain degré d'acidité est atteint. »

Ces conclusions, qui témoignent de l'harmonie et de l'antagonisme alternatifs des deux espèces dont M. Hueppe a démontré la coexistence dans les expériences de Neelsen, peuvent se résumer dans les propositions suivantes : la réaction du milieu doit être neutre ou alcaline, pour que le microbe se développe; acide, pour qu'il produise le pigment ; un développement lent, un accroissement progressif d'acidité dans le milieu primitivement neutre ou alcalin concilient ces deux nécessités contraires.

L'utilité de l'acide pour la production du pigment est confirmée par les auteurs qui ont traité la question après Neelsen.

C'est ainsi que M. Hueppe remarque dans les cultures en lait stérilisé un ton bleu mat, au lieu de gris, pour peu que la réaction du lait soit acide, au lieu d'être amphotère. Le même savant constate les bons effets de l'emploi du phosphate acide de potasse au lieu du phosphate neutre, dans les milieux nourriciers au tartrate et au lactate d'ammoniaque. L'addition d'acide lactique donne aussi de bons résultats, comme le vérifient MM. Scholl et Heim. Ce dernier auteur recommande l'usage de bouillon et de gélatine-bouillon non neutralisés. J'ai constaté, de mon côté, l'avantage des milieux acides. Il suffit de mettre parallèlement en culture une série de bouillons, additionnés de doses croissantes d'acide lactique. Le rôle favorable de l'acide se manifeste dans la gamme ascendante des tons bleus graduellement accrus. Le ton bleu paraît même d'autant plus prononcé dans les numéros élevés de la série que deux faits concourent à le renforcer : la production intrinsèque plus abondante du pigment, et la suppression de la fluorescence verte qui subsiste encore dans les numéros inférieurs [1]. Mais on conçoit que l'augmentation de l'acidité est bientôt limitée par la sensibilité du microbe aux acides [2]. C'est la sensibilité du milieu même qui mettrait d'abord obstacle à l'emploi de ce moyen pour obtenir un bon effet dans le lait.

On voit à quelles difficultés on se heurte dans l'addition initiale d'acide aux milieux de culture, et cela pour aboutir, comme production de couleur, à un résultat bien inférieur encore au but visé. Il faut reconnaître qu'un organisme vivant, comme le ferment lactique, peut seul, par une modification lente et graduelle des milieux, corrélative à son développement, réaliser l'accord voulu entre la quantité d'acide nécessaire et la susceptibilité du bacille cyanogène. L'analyse précitée de M. Neelsen, autant que l'expérience de M. Heim que j'ai rapportée, montre avec quel degré de contingence se rencontre cet accord

1. C'est à propos du lait bleu qu'on serait le moins fondé à contester l'influence favorable de l'acidité des milieux sur la production des pigments, que Wasserzug a proclamée en général. Je dois faire remarquer pourtant que cet auteur et ceux qui l'ont suivi ont dû forcément méconnaître, à propos de ce bacille cyanogène comme du bacille pyocyanique, la part qui revient, dans l'exaltation du pigment spécifique en culture acide, à la suppression de cette fluorescence, qu'on ne savait pas distinguer encore.

2. M. Reiset a enrayé la propagation du lait bleu en additionnant le lait de 0 gr. 5 par litre d'acide acétique cristallisable.

dans les conditions naturelles. Mais, même dans les conditions rigoureuses qui faisaient défaut pour ces observateurs, en réalisant dans des cultures pures l'association du ferment lactique et du bacille cyanogène, on ne peut songer à assurer le succès de l'expérience par une de ces formules précises assurant la reproduction expérimentale d'un phénomène. Une difficulté nouvelle résulte du grand nombre de ferments lactiques et de leur inégale activité.

J'ai donc cherché à obtenir l'acidité du milieu par le fait seul du développement du bacille cyanogène à l'état de pureté. J'y ai réussi en employant le glucose. Le lait, additionné de 2 0/0 de glucose et stérilisé, ensemencé avec le bacille cyanogène, devient acide et se recouvre d'une couche bleue qui offre les caractères que M. Reiset décrit dans le bleuissement spontané : pellicule saturée à la surface, surnageant la couche de crème indemne et sous laquelle reparaît la couleur bleue ; aspect luisant de cette pellicule. On note cette seule différence en faveur de l'expérience, la constante continuité et l'extension à toute la surface de la couche bleue, ce dont rend bien compte l'absence des espèces rivales aérobies qui se disputent l'accès de l'air dans l'autre cas. Des inégalités résultent seulement de l'agglomération des germes en certains points, ce qui produit des îlots plus saturés et plus sombres sur le fond uniforme et de teinte plus claire. Toutefois, on n'atteint pas ainsi au ton bleu indigo du phénomène spontané. Mais je suis arrivé à ce résultat en ajoutant au lait, en plus du glucose, 1 0/0 de lactate de soude. Cette addition n'est pas nécessaire dans le bouillon. Le glucose y suffit à donner un bleu magnifique. Il en est de même dans le milieu artificiel inspiré de la formule de Hueppe, légèrement modifiée :

Lactate d'ammoniaque.	1gr. » 0/0
Phosphate de potasse neutre.	0, 50 »
Sulfate de magnésie.	0, 25 »

L'emploi de phosphate neutre, au lieu de phosphate acide, en laissant le milieu alcalin, ne permet pas, en l'absence du glucose, la formation du pigment bleu. Les trois races chromogènes s'y distinguent, dès lors, par les caractères que j'ai décrits, d'après la culture en bouillon. Il n'est que plus frappant de les voir amenées, par la simple addition de glucose au milieu, à produire le beau bleu qui caractérise l'espèce.

Je me suis tenu de préférence, pour le milieu d'épreuve destiné à mettre en lumière ce caractère spécifique, au bouillon glucosé, solidifié ou non par la gélatine ou la gélose. J'y ai éprouvé un germe d'une culture, qui m'était venue en main en même temps et de la même source que le bacille cyanogène de Hueppe, avec la mention : *bacille du lait bleu de Lœffler*, et au sujet duquel le mémoire de M. Scholl m'a fourni quelques renseignements. Ce germe provient des cultures de M. Lœffler, à l'Institut de Berlin. Il se distinguait du grand nombre de germes de lait bleu, d'origines diverses, que M. Scholl étudiait parallèlement, par l'inconstance remarquable des réactions dans le lait, le lactate d'ammoniaque. Cependant, en raison du beau ton bleu qu'il donne sur gélatine, M. Scholl était porté à conclure à une variété du bacille cyanogène. Il n'est pas douteux qu'il appartient à cette espèce, d'après la culture en bouillon glucosé, qui fournit un beau bleu. Par la culture dans le bouillon ordinaire, j'ai, de plus, identifié ce bacille de Lœffler avec la race productrice de pigment gris sans fluorescence.

C'est certainement aussi un type de cette même race qui est échu à M. Heim, pour lequel ce savant évoque la notion de variété dans les dernières lignes de son mémoire, et dont le rattachement spécifique s'effectuerait par la culture en bouillon glucosé plus sûrement que par tout autre milieu. Cet auteur a vu, sous diverses influences, décroître et disparaître le pouvoir chromogène en gélatine. Dans une note récente, M. P. Behr [1] a décrit, à son tour, une race de bacille du lait bleu qui ne produit plus de pigment sur gélose et gélatine-bouillon. Le bouillon glucosé serait assurément un milieu préférable, pour établir l'identité d'espèce de ces germes dégradés, à la pomme de terre qu'a employée M. Behr, et où les résultats des cultures, d'après les recherches de M. Heim, à l'occasion même du bacille cyanogène, sont extrêmement variables.

La culture en bouillon glucosé ne garde pas longtemps sa belle couleur bleue. Cette couleur, très altérable, fait place à une teinte gris vert, en même temps que le bouillon s'éclaircit par le dépôt des microbes qui forment au fond un sédiment

1. Sur une race de bacille du lait bleu ne formant plus de pigment. *Centralblatt für Bakteriologie*, t. VIII, 1890, et ces *Annales*, t. V, p. 60.

bleuté. C'est un phénomène de teinture, car les microbes ne sont pas bleus, comme on peut s'en assurer sur le sédiment formé dans les circonstances où le bleu ne prend pas naissance. Une culture bleue du bacille peut servir à teindre la caséine, le gluten, la soie ; la teinture est tenace, mais de ton changeant, et aboutit au vert sale.

Parfois, le microbe a survécu au développement d'acidité, qui lui est d'ordinaire nuisible, et a fait succéder la fluorescence verte avec la réaction alcaline à la primitive coloration bleue.

II

Les auteurs qui ont traité du lait bleu ne se sont pas bornés à en établir l'origine microbienne. Ils ont prétendu pénétrer plus avant dans la connaissance du phénomène et déterminer quels éléments du lait fournissent au microbe la matière première pour l'élaboration du pigment. J'exposerai et examinerai les théories qu'ils ont émises sur ce point, avant de donner les conclusions auxquelles je suis arrivé.

M. Neelsen avait vu, dans ses expériences en milieu artificiel, le lactate d'ammoniaque suffire à la production de la couleur bleue. Il en concluait que le même corps joue ce rôle dans le lait : avant de produire le pigment, le bacille en prépare les éléments, l'acide lactique et l'ammoniaque, respectivement aux dépens du sucre de lait et de la caséine. Nous savons déjà qu'un vice opératoire a faussé cette seconde partie de la conclusion. Nous aurons l'occasion de revenir sur la première.

M. Hueppe, qui a vérifié, avec le germe pur, la production de bleu dans le lactate d'ammoniaque, nie que cette combinaison intervienne dans le bleuissement du lait. Il n'y a pas d'ammoniaque, d'après lui, dans le lait bleu spontané, à réaction acide, mais seulement des lactates alcalins et de l'acide lactique. Or, les lactates alcalins n'ont exercé aucune influence dans des expériences, où M. Hueppe les ajoutait à un milieu artificiel au tartrate d'ammoniaque : il ne se produisait qu'une coloration verte, en présence comme en l'absence de ces lactates. Et l'acide lactique n'a pas d'action spécifique ; il peut être remplacé par tout autre acide pour le rôle où le réduit M. Hueppe, qui est de

faire passer à un bleu plus foncé le gris bleu des cultures pures. D'un autre côté, cette couleur gris bleu est apparue dans des cultures pures dans la caséine. C'est la caséine, en conclut M. Hueppe, qui est seule en cause dans le bleuissement du lait. L'acide lactique ne fait qu'accroître la couleur par la réaction commune à tous les acides et, en coagulant la caséine, permet à la couleur de se localiser.

On peut trouver sujette à caution l'assertion de M. Hueppe, relative à l'absence d'ammoniaque dans le lait bleu, quand il a été donné de sentir l'odeur de triméthylamine, qu'exhalent les cultures pures de bacille cyanogène dans le bouillon; mais, puisqu'il s'agit du lait bleu spontané, on conçoit que bien d'autres germes, en dehors du bacille cyanogène, y puissent fournir cette ammoniaque, terme constant de la dislocation de la matière azotée par les microbes aérobies. En ce qui concerne le rôle exclusif attribué par M. Hueppe à la caséine, on aime à ne pas douter, sans qu'il en fasse mention, que M. Hueppe n'ait eu d'abord le soin de purifier complètement la caséine, dont le coagulum muqueux peut entraîner assez des éléments normaux du lait, ou des produits de son altération si prompte à survenir, pour entretenir la vie et les fonctions d'une génération de microbes. Cependant Neelsen ni Haubner[1] n'ont obtenu de coloration dans la caséine chimiquement pure; je n'ai pas été plus heureux, de mon côté. Il convient, d'ailleurs, de remarquer que la culture sur caséine n'a encore donné que du gris bleu. De plus, si l'on ajoute, à la fin de la culture, l'acide qui a manqué faute de ferment lactique, et qui, dans l'opinion de M. Hueppe, est nécessaire uniquement pour parfaire le bleu, on n'obtient pas l'intensité de couleur qu'on observe dans le phénomène naturel. Il est donc évident que le pigment formé est en quantité inférieure dans ces conditions expérimentales. M. Hueppe, pour expliquer cette différence de couleur, a recours à la température. « Plus la température est basse, dit-il, et la formation d'acide lente, plus le bacille pourra faire, aux dépens de la caséine, du pigment gris bleu, qui, lorsqu'un certain degré d'acidité est atteint, se change en bleu intense. Au contraire, pour une température plus élevée, où la formation d'acide est activée, la

[1] Neelsen, *loco citato*, page 496.

coloration bleue décroît. » Mais, en faisant intervenir la formation d'acide, M. Hueppe vise de nouveau les conditions du bleuissement spontané, puisqu'il ne se forme pas d'acide dans les cultures en milieu stérilisé. Or, la température, la durée du développement n'importent pas dans ce dernier cas, comme il est facile de le vérifier; et la différence du résultat expérimental avec ce qu'offrent les circonstances naturelles reste encore inexpliquée.

M. Scholl s'est efforcé de concilier l'opinion de M. Hueppe sur la caséine avec le fait primordial, si important, du succès des cultures dans le lactate d'ammoniaque. Mais sa théorie, qui admet une scission de la caséine en ammoniaque et en acide gras, ne repose sur aucun fait d'expérience.

On peut s'étonner, à bon droit, du souci, commun à ces auteurs, de rapporter à la caséine exclusivement la source de l'azote nécessaire au microbe, alors que M. Hueppe a obtenu les mêmes effets de couleur avec l'urée, l'asparagine, la leucine, comme avec le tartrate d'ammoniaque. Le lait renferme au moins un de ces corps, entre autres éléments azotés. Je laisserai du reste volontiers de côté la question de savoir quel élément du lait fournit l'azote à un organisme dont on a ainsi reconnu l'aptitude à assimiler ce corps sous des états si divers. Dans le grand nombre d'éléments qui constituent le lait, c'est, d'ailleurs, en dernière analyse qu'il faut s'adresser à un élément de structure aussi compliquée et de composition aussi peu connue que l'est la caséine pour y rattacher la fonction cyanogène. Du reste, les recherches expérimentales doivent faire conclure dans un sens tout différent.

La culture en milieux artificiels a montré quels composés simples peuvent servir à la vie et aux fonctions du microbe, et l'on ne conçoit pas que le développement dans le lait doive constituer une exception. La production du pigment bleu n'est, comme a dit M. Neelsen, qu'un des cas où s'applique le pouvoir que M. Pasteur a reconnu aux organismes inférieurs, de former les corps les plus complexes à l'aide des combinaisons les plus simples. Il n'y a de particulier pour le bacille cyanogène que la nécessité du milieu acide pour qu'il exerce sa fonction. Car, ce qui se dégage, en réalité, de toutes les expériences, c'est la dépendance de la fonction cyanogène vis-à-vis de l'acide, et non la préséance de la fonction dont l'acide parachèverait le produit.

Comment donc agit l'acide, que procure d'ordinaire le ferment lactique, et que le bacille cyanogène se prépare, dans mes expériences, au moyen du glucose? Est-ce en fournissant au microbe un aliment mieux approprié à l'élaboration du pigment bleu que les éléments normaux du lait, ou en favorisant par sa présence, par la réaction qu'il communique au milieu, cette production du pigment aux dépens des éléments normaux qui servent déjà au développement du microbe? On doit écarter cette dernière interprétation, du fait que, dans l'expérience où il n'a été ajouté que du glucose à du lait normal, on n'a pas obtenu le beau bleu caractéristique. Mais nos essais n'ont pas été bornés à ce résultat incomplet, qui restreindrait fort l'intérêt d'une discussion sur le mode de production du bleu, puisqu'on n'en pourrait pas étendre les conclusions au phénomène habituel.

Au contraire, le bleu habituel s'est produit, quand nous avons ajouté, en même temps que le glucose, du lactate de soude, c'est-à-dire un composé dont un des termes, s'il n'existe pas normalement dans le lait, est le produit qui se forme dans l'altération la plus ordinaire du lait, celle au moins qui accompagne toujours le bleuissement. Puisque ce composé, associé à l'acide d'origine glucosique, a permis d'obtenir le ton et l'intensité de bleu que l'acide lactique suffit à produire dans les circonstances naturelles, n'en doit-on pas conclure que, vraisemblablement, il régénère de l'acide lactique, soit par l'action chimique de l'acide provenant du glucose, soit par une intervention du microbe, d'ordre biologique? Et ainsi, l'acide lactique se révèle comme l'élément nécessaire de la production du bleu, et revêt un caractère de spécificité que toutes les expériences conduisent à admettre.

L'expérience suivante met bien en évidence cette part que nous attribuons à chacun des corps employés au succès de la reproduction du lait bleu. J'ai substitué dans le milieu nourricier, dont j'ai donné la formule, après addition de glucose, les sels ammoniacaux de différents acides organiques au lactate d'ammoniaque, et j'ai vu, en y cultivant le bacille cyanogène, y survenir des tons différents de bleus et de gris variables. Le résultat, semble-t-il, eût dû être univoque, si l'acide formé du glucose avait une part prépondérante, et non simplement auxiliaire, dans l'élaboration de la matière pigmentaire. Et, d'autre part, le bleu devrait être le même, si la nature de l'acide organique ajouté

était indifférente. Un seul sel a donné le même bleu que le lactate d'ammoniaque : c'est le succinate d'ammoniaque. Le fait est à rapprocher de la grande analogie de composition et de l'origine microbienne que présentent les deux acides.

Je n'ai pas recherché particulièrement la nature de l'acide ou des acides formés par le bacille cyanogène aux dépens du glucose.

L'acide lactique est donc, dans tous les cas, la cause de la production du pigment bleu par le bacille cyanogène. Le lait n'est particulièrement propre à devenir le siège de cette coloration bleue, qu'à raison de l'altération qu'il offre le plus fréquemment. Si le lait n'a pas subi la fermentation lactique, le bacille cyanogène, comme nous avons vu, y donne à peine de pigment. S'il a été additionné seulement de lactate de soude, il ne se produit qu'une teinte verte. S'il n'y a que du glucose, le bacille marque sa faveur pour le milieu acide qui en résulte, en produisant une couleur bleue. Si le lait a subi la fermentation lactique, ou si, dans les conditions expérimentales, il a été additionné de lactate de soude et de glucose, le beau bleu fait son apparition. Le bouillon additionnné simplement de glucose, donne au contraire ce bleu d'emblée ; il est mieux constitué que le lait pour l'exercice de la fonction cyanogène, parce qu'il entre dans sa composition normale un acide lactique, l'acide sarcolactique du tissu musculaire.

Quant à décider si le pigment bleu est sécrété tout formé par le microbe, ou s'il résulte, comme le pensait M. Hueppe, du virage par l'acide d'un produit de sécrétion d'abord presque incolore, la question ne me paraît pas susceptible de recevoir une solution des données actuelles de l'expérience. En effet, dans les conditions où se produit spontanément le bleuissement du lait, comme dans celles où nous savons le reproduire, la formation de l'acide est tout au moins synchrone à l'apparition du bleu, et on n'observe pas le pigment en dehors de l'acide. On ne peut pas, d'un autre côté, appliquer au cas général le cas si particulier du lait stérilisé, où l'action de l'acide sur le pigment gris n'aboutit encore qu'à un bleu peu comparable au bleu normal. C'est à de nouvelles recherches qu'il appartient d'établir les rapports qui existent entre ces pigments et d'approfondir la nature de la matière colorante bleue qu'on peut désormais obtenir à coup sûr.

III

On trouve donc pour le bacille cyanogène, comme pour le bacille pyocyanique, que la fonction est dépendante du milieu, que dans un même milieu elle varie avec les différentes races, qu'on peut constituer un milieu, où reparaît la fonction caractéristique de l'espèce, dans les races mêmes où elle fait défaut au regard des autres milieux. Avec le bacille cyanogène, nous pénétrons bien le mode d'action de son milieu spécial. Il se rapporte à l'addition au bouillon ordinaire de glucose que le microbe peut transformer en acide, condition nécessaire pour dégager le principe du pigment bleu, l'acide lactique. Le bouillon offre, en effet, cet acide à l'état de combinaison inutilisable même pour le représentant le plus élevé de l'espèce cyanogène, le microbe de la race type, et surtout de mélange avec des composés où le bacille trouve, mieux adaptés à l'utilisation immédiate, les éléments d'une autre fonction chromogène, de la fluorescence; cette dernière fonction est reléguée au second plan, dès que le milieu est devenu acide. Je rappellerai que, avec le bacille pyocyanique, il a fallu, pour obtenir le pigment spécifique sans fluorescence, renoncer au bouillon complet, et n'employer de ses éléments que la peptone [1], que j'ai reconnue le mieux appropriée à la fonction pyocyanogène.

On voit, par ces deux exemples, le rôle prépondérant du milieu dans cette révélation de la fonction spécifique, chez les germes mêmes dégradés. C'est le méconnaître que d'imaginer qu'un de ces germes peut, par des passages nombreux dans ce milieu favorable, redevenir apte à manifester de nouveau cette fonction dans les milieux pour lesquels elle n'existait plus. Ainsi, M. Behr a cherché sans succès à restituer à sa race dépourvue d'action sur gélose et sur gélatine, l'aptitude chromogène dans ces milieux, par une série de cultures sur la pomme de terre, où cette race continuait de produire du pigment. On doit plutôt se représenter l'échelle des milieux, où la race normale développe à tous les degrés la fonction chromogène, comme restreinte par rapport aux

1. Additionnée, pour un meilleur rendement, de glycérine et solidifiée à la gélose, et non à la gélatine, comme il est imprimé, par erreur, à la dernière page de mon mémoire dans ce volume, page 77, ligne 12.

races dégénérées; le milieu spécial figure un degré extrême, au-dessus duquel elles ne peuvent plus exercer cette fonction chromogène. La fonction subsiste au regard de ce milieu, favorisé de quelque circonstance particulière. Ce serait mal s'exprimer que de dire qu'elle y a été recouvrée. On doit encore moins admettre qu'elle puisse y reprendre pied pour se réintroduire dans les milieux d'où elle s'est retirée. Pour bien faire comprendre ma pensée, dirait-on que la bactéridie charbonneuse, atténuée au point de n'être plus virulente pour le cobaye adulte, a recouvré la virulence, parce qu'elle tue le cobaye d'un jour? Le cobaye d'un jour fait l'office de milieu spécial, où peut se révéler le degré de virulence que la bactéridie a conservé. Songerait-on à la rendre virulente à nouveau pour le cobaye adulte par des passages multipliés dans ce cobaye d'un jour?

IV

Il ne peut être question ici de pousser dans tous les sens le parallèle entre le bacille cyanogène et le bacille pyocyanique, ni de relever tous les points sur lesquels ils diffèrent ou se rapprochent. Quelques-unes des dissemblances doivent, cependant, retenir encore notre attention. C'est ainsi que, pour obtenir la race chromogène dépourvue de fluorescence, il a suffi, avec le bacille cyanogène, de deux passages dans l'albumine d'œuf. Je rappellerai que, pour le bacille pyocyanique, ce résultat n'a été atteint qu'après une longue série de cultures dans ce milieu. J'ai admis, dans ce cas, que l'adaptation de la fonction fluorescigène au milieu albumineux était devenue si étroite que le microbe était désormais incapable de reproduire cette fonction dans un autre milieu. Je ne pouvais accepter une interprétation semblable pour la modification qui était si rapidement survenue dans le bacille cyanogène. De plus, quand je reportai dans le bouillon la semence empruntée à la culture suivante en albumine, soit au troisième passage, je vis reparaître les deux pigments, comme avec le bacille primitif. Ce dernier fait était en contradiction complète avec les résultats de mes recherches antérieures, autant qu'avec la notion qui est dans la science, au sujet du sens où s'exerce jusqu'ici notre action sur les microbes en cultures artificielles. Nous pouvons bien les dégrader, affaiblir par exemple

leur virulence, ou les réduire de deux fonctions chromogènes à une seule ou même à la privation de toute fonction; mais nous ne savons pas les faire remonter, du moins *in vitro*, à la plénitude d'aptitude fonctionnelle dont ils sont déchus. J'eus l'occasion d'observer un autre fait du même ordre. Au cours d'une série de cultures en bouillon de la race fluorescigène, la fluorescence sombre propre à la race normale reparut dans un terme de la série et se maintint dans la suite des cultures qui en provinrent. Ces deux cas d'évolution dans un sens si inattendu ont reçu une explication de l'expérience suivante.

J'ai fait des plaques de gélatine avec les cultures mères des cultures qui montraient ces anomalies. J'y ai obtenu des colonies de couleurs différentes qui témoignaient de la non homogénéité de ces cultures. La deuxième culture en albumine qui m'avait fourni la race à pigment gris donna sur la plaque, à côté des colonies de cette race, des colonies vert-bleu sombre de la race à deux pigments ; la troisième culture en albumine, dont l'ensemencement dans le bouillon avait reproduit les deux pigments, conservait, à côté des colonies vert-bleu sombre, des colonies rougeâtres de l'autre race. Enfin, une culture en bouillon, qu'on eût dite de race fluorescente pure, donna des colonies des trois races chromogènes. J'ai dit que la semence empruntée à la culture de M. Hueppe, au bout d'un certain temps, ne me faisait plus que de la fluorescence en bouillon. La culture sur plaque révélait encore dans ce bouillon des germes de la race type. Plus tard la même culture ne m'a plus donné que des colonies de la race fluorescente et de la race incolore. La dégradation s'était aggravée.

J'avais donc dû de retirer la race à pigment gris du second passage en albumine à l'une de ces deux circonstances : ou que j'étais tombé par hasard sur ses germes à l'exclusion des autres, dans le prélèvement de la semence en milieu non homogène, ou que, dans le mélange de germes ensemencés, les organismes de cette race avaient prévalu, favorisés par quelque point dans la concurrence vitale. Le bacille pyocyanique et le bacille cyanogène ont ainsi fourni, chacun de son côté, un exemple de l'intervention d'un des deux facteurs principaux des modifications dans les êtres vivants, l'influence du milieu et la sélection.

Ce n'est pas à dire que l'une de ces deux causes de change-

ment doive être attribuée exclusivement à chacun des bacilles, ni que les variations que m'a offertes le bacille pyocyanique ne puissent être aussi bien justiciables de la seconde. Une non homogénéité des cultures, à l'idée de laquelle les recherches de Wasserzug avaient préparé, ne m'a pas apparu comme cause des phénomènes que j'ai observés avec le bacille pyocyanique. Pour le bacille cyanogène, c'est au contraire cette cause qui intervient dans un grand nombre des faits observés par les auteurs, et qui fournit l'explication de changements si divers, dont certains ont donné l'illusion du perfectionnement du bacille.

Je dois dire encore que cette non homogénéité des cultures contribuait à la production de la couleur bleue dans le bouillon glucosé, quand on y reportait une des deux races qui se montrent dépourvues de pigment gris en bouillon, la race fluorescigène et la race sans pigment. Des germes moins dégradés qui se dissimulaient dans cette culture, et avaient échappé à la cause de dégénérescence dont ces races étaient issues, étaient seuls les agents de la coloration bleue. J'ai dû conclure ainsi, quand j'ai reconnu l'impossibilité d'obtenir du pigment bleu en bouillon glucosé, en partant d'un germe d'une de ces races dégénérées, isolé à l'état de pureté sur gélatine. Au contraire, le pouvoir de faire de la pyocyanine en gélose-peptone glycérinée survivait à cette épreuve pour les races dégénérées du bacille pyocyanique.

On en devrait conclure que le bacille cyanogène perd plus tôt son caractère spécifique, et que ses deux dernières races se confondent d'une manière irrévocable dans la foule des espèces banales qui leur ressemblent, s'il était prouvé qu'on ne peut pas réaliser un meilleur milieu que le bouillon additionné de glucose pour rappeler la fonction spécifique et exalter le pouvoir cyanogène dans les cas où le bouillon glucosé se montre inefficace.

Je signalerai encore la différence qu'offrent les cultures dans le lait stérilisé. Le bacille cyanogène n'y produit pas de fluorescence verte; le bacille pyocyanique y produit ce pigment. Le lait en contient les éléments; mais les deux bacilles ont une aptitude inégale à les utiliser.

V

Le bacille cyanogène apporte, après le bacille pyocyanique, un nouvel exemple d'un microbe pourvu de deux fonctions. Un pigment différent correspond à chacune de ces fonctions, et en a facilité l'étude. Les conclusions de cette étude, rapprochées des résultats de mes recherches antérieures, me semblent susceptibles d'une application générale. C'est la justification de l'insistance que j'ai mise à revenir sur des faits que j'avais exposés déjà, comme la dissociation des fonctions et la possibilité d'isoler chacune d'elles dans un milieu ou dans une race. Il n'était pas superflu d'en apporter une preuve nouvelle. C'est une notion qui tend à s'établir dans la science que celle de la distinction d'une matière vaccinante et d'une matière toxique dans les produits des microbes pathogènes. Si l'avenir la consacre définitivement, il ne sera pas sans utilité d'avoir appris, par l'exemple des microbes chromogènes, que des artifices de culture pourraient réaliser la séparation de matières de propriétés et d'intérêt si différents.

A mesure qu'on pénètre dans l'étude des produits de culture des microbes, on découvre, pour une seule espèce, un plus grand nombre de propriétés physiologiques de ses produits. On n'a pas de peine à concevoir chacune de ces propriétés comme réductible à un composé distinct. C'est une notion qui n'est pas plus difficile à admettre que celle de la production dans une cellule végétale de composés aussi différents de propriétés que ceux que l'on isole de l'opium. Quel intérêt n'y aurait-il pas à faire produire, par le pavot, la morphine et les autres alcaloïdes narcotiques, à l'exclusion des alcaloïdes convulsivants ! Les faits que nous venons d'exposer montrent que la chose est possible avec les produits des microbes, que la thérapeutique un jour utilisera certainement.

Le bacille cyanogène démontre, en outre, plus clairement sans doute que tout autre microbe, combien la fonction est chose contingente, dépendante de circonstances minimes ou liée étroitement à une condition déterminée. Mais, au regard des influences souvent imperceptibles à nos moyens grossiers d'analyse et qui pèsent d'un si grand poids sur la fonction microbienne,

le microbe offre un merveilleux instrument d'analyse qui dépasse en délicatesse nos réactifs les plus sensibles. Un fait, unanimement constaté, dominait l'histoire du bacille du lait bleu : c'est la nécessité d'une réaction acide du milieu. Cette nécessité se manifeste d'une façon éclatante dans la différence d'aspect des cultures dans le bouillon ordinaire et dans le bouillon où l'addition de glucose permet au bacille de faire de l'acide. Si bien que, de cette seule expérience, où le glucose seul modifie notre milieu de culture le plus habituel, l'importance de l'acidité, prise d'une manière absolue, paraissait confirmée. L'épreuve du glucose est faite dans le lait ; l'acidité survient comme dans le bouillon ; le microbe reconnaît la présence de la réaction qu'il préfère, par une production de bleu. Mais il ne produit le bleu caractéristique que si la présence de l'acide lactique est assurée [1]. Le phénomène naturel est alors reproduit ; le succès primitif dans le bouillon trouve son explication ; la spécificité de l'acide lactique est établie. C'est cet acide, en effet, que le bacille cyanogène trouve dans la nature. Mais il faut qu'un autre organisme l'ait préparé aux dépens du lactose qu'un seul produit naturel, le lait, peut offrir. Il faut aussi que cette fermentation lactique n'ait pas dépassé un certain degré, parce que trop d'acide s'oppose au développement du bacille cyanogène. C'est, en résumé, sous cette étroite condition, un nouvel exemple de symbiose, dont les cas se multiplient dans la science. Il est légitime d'assimiler le bleuissement du lait à une maladie. On serait alors en droit de dire que le lait sain échappe à cette maladie bleue, qu'elle est une affection secondaire, qu'elle envahit le lait quand il est déjà gravement atteint, ou, comme dans mon expérience avec le glucose, quand sa constitution a été modifiée, qu'il a été rendu diabétique, si l'on me permet cette image, sous le bénéfice, moins de la justesse de l'expression que de l'idée suggestive qui s'y lie.

1. Toutes les cultures du bacille cyanogène ont été faites dans l'étuve à 22°.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DE LA MICROBIOSE MALARIQUE[1]

PAR M. LE PROF. B. DANILEWSKY, A CHARKOFF.

(Avec le planche XIX.)

Confirmant les conclusions auxquelles je suis arrivé dans mes notes antérieures, j'insisterai dans ce mémoire sur la découverte que *les oiseaux souffrent comme l'homme, non seulement d'un paludisme chronique, mais aussi d'une affection malarique aiguë, semblable à la fièvre intermittente de l'homme*[2]. Ce fait est d'autant plus intéressant que, récemment encore, on déniait l'existence de l'impaludisme des animaux .

De l'ensemble des faits connus jusqu'à présent, il découle que les hématozoaires malariques de l'homme et des oiseaux sont au moins très ressemblants entre eux, sinon identiques.

Les oiseaux étudiés autrefois par moi ne différaient des individus normaux (c'est-à-dire ne renfermant pas d'hématozoaires) ni au point de vue de la température de leur corps, ni par leur attitude générale. C'est pour cela que je les ai désignés provisoirement comme «bien portants», c'est-à-dire ne présentant pas de signes évidents d'une affection générale de l'organisme. Cependant, dans la saison la plus chaude, cette microbiose du sang peut s'aggraver et amener la mort de l'oiseau, la destruction des hématies devenant plus considérable et aboutissant au développement

1. Une note préliminaire sur ce sujet a été publiée dans le *Wratch*, 1890, n° 47, ainsi que dans ces *Annales*, 1890, décembre.

2. V. l'article de Verheyen dans le *Dictionnaire de médecine vétérinaire* de Bonley et Raynal, sur la fièvre intermittente.

plus abondant de la mélanine (mélanémie, mélanose de la rate, de la moelle des os, du foie, etc.). Ces phénomènes occasionnent une forte anémie, la perte d'appétit, l'épuisement et la mort. Je n'ai observé que quelques cas semblables, la grande majorité des oiseaux supportant très bien l'infection malarique chronique, au moins dans les localités près de Charkoff. Quelquefois on pouvait constater une disparition temporaire des hématozoaires; mais, au bout d'une période plus ou moins longue, ces parasites apparaissaient de nouveau et même en plus grande quantité qu'auparavant. Il est important de noter que cette réapparition se fait sans une nouvelle infection et pendant le séjour de l'oiseau au laboratoire. Des faits analogues se rencontrent chez l'homme, lorsque guéri en apparence de son impadulisme, il quitte la localité malarique et subit néanmoins de nouvelles atteintes de la maladie, sans être infecté de nouveau. D'après l'avis de plusieurs auteurs, le traitement de ces cas par la quinine est presque inutile, ce qui s'explique par le fait qu'alors ce ne sont plus les états amiboïdes, mais bien les formes en croissant (*Laverania* de Grassi) qui se trouvent dans le sang. Or il a été démontré que la quinine n'agit que sur les formes amiboïdes [1].

Tous les faits cités démontrent suffisamment l'analogie très grande qui existe entre les hématozoaires de l'homme et des oisaux. C'est justement en vue de cette analogie que je me crus autorisé à rattacher les hématozoaires aviaires à la catégorie des microbes malariques. Malgré l'opposition faite par plusieurs savants contre cette manière de voir, je maintiens ma thèse, que les hématozoaires de l'homme et des oiseaux appartiennent au même groupe, probablement au même genre de parasites.

On doit reconnaître que la présence des hématozoaires ordinaires dans le sang des oiseaux est un signe, non d'une simple symbiose, mais bien d'une véritable infection chronique. Mais, je l'ai démontré en 1890, en dehors de cette affection, *les oiseaux sont encore sujets à une fièvre aiguë de l'impadulisme.* Ma découverte d'un état de reproduction par sporulation a été depuis confirmée par Grassi et Felleti, Celli et Sanfelice, et autres.

Voici les faits principaux que j'ai pu constater :

1. Mes expériences sur les oiseaux fébricitants ont confirmé ce résultat. Même les injections quotidiennes de quinine ne diminuèrent ni le nombre, ni la mobilité des hémogrégarines et des polimites.

Chez des oiseaux (pies, corbeaux) en apparence bien portants et qui ne renfermaient point d'hématozoaires, les globules rouges sont brusquement attaqués : dans leur intérieur apparaissent des taches claires, formées par des cytozoaires (pseudo-vacuoles). Ces corps grandissent et se remplissent de granules de mélanine. Le nombre de ces parasites est variable : dans les formes faibles, il y a une hématie attaquée parmi plusieurs centaines de normales; dans des formes ordinaires, le rapport est de 1 à 20 ou 50; il est de 1 à 5 ou à 8 dans les affections graves. Au mois de juin 1890, j'ai observé une pie malade et anémique, chez laquelle toutes les hématies étaient atteintes de très petits hématozoaires, présentant des contours peu nets et ne renfermant presque point de pigment; un très grand nombre d'hématies renfermaient plusieurs (jusqu'à 6) parasites. Les hématozoaires adultes de forme sphérique étaient par contre très rares. Il est évident que dans ce cas l'affection était des plus aiguës; la température était au-dessus de 43° C. La pie mourut peu de temps après.

Des cas pareils sont cependant assez rares, au moins dans notre localité. On observe des phénomènes analogues également dans la fièvre chronique. Ainsi chez un hibou, en avril 1890, presque toutes les hématies renfermaient de 1 à 3 pseudovacuoles. Les cytozoaires étaient de la plus petite taille, et ne renfermaient presque pas de mélanine; l'oiseau avait l'air vigoureux, mangeait bien et ne présentait aucune élévation de température. L'observation, poursuivie pendant un mois entier, démontra un accroissement continu et lent dans le développement et la reproduction des parasites; à la fin de mai on ne pouvait presque plus trouver de jeunes parasites dans le sang, qui ne renfermait que des formes sphériques. L'état général de l'oiseau ne présenta aucun changement. Il est évident que l'accroissement des phénomènes hématogénétiques au printemps a renforcé l'organisme dans sa lutte avec les hématozoaires.

Mais revenons à la description de l'affection aiguë. Parallèlement à l'apparition et à la croissance des cytozoaires dans le sang de l'oiseau, l'état général de ce dernier s'altère : il devient faible, peu sensible à ce qui l'entoure, ne réagit que faiblement ou point du tout vis-à-vis des excitations lumineuses et autres; le plumage s'altère, les plumes se hérissent. *La tempéra-*

ture monte de 1°, 1°,5 *et même plus* (v. plus loin l'histoire de la maladie); l'appétit disparaît, le poids diminue notablement ; la respiration est pénible : la bouche reste souvent ouverte ; on observe même des phénomènes convulsifs : l'oiseau frissonne et tombe à la renverse. Il est évidemment sous l'influence d'une grave maladie aiguë. Chez une pie, les symptômes convulsifs se déclarèrent 3 jours après l'apparition des parasites sanguins. L'issue de la maladie fut fatale. Le développement des accès décrits correspond habituellement à l'augmentation de la microbiose du sang. Pourtant il fut impossible de constater dans tous les cas un parallélisme rigoureux entre ces phénomènes. Quelquefois la température baissait et l'état général s'améliorait malgré une forte microbiose ; quelquefois c'est l'inverse qui avait lieu. Le seul fait régulier est que l'élévation de température a toujours lieu *après* l'apparition des microbes dans le sang. Ceux-ci se développent complètement en quelques jours (3-4). Ils se segmentent et se transforment en spores libres dans le plasma. Après cela, dans les *formes typiques*, survient le rétablissement ; le sang est en état d'*amicrobiose*. Dans d'autres cas la mort survenait pendant l'acmé de la fièvre. Enfin il y a des formes de microbiose où la sporulation de la première génération des cytomicrobes se fait en même temps que la seconde génération apparaît sous forme de pseudovacuoles primaires. Dans de pareilles conditions la durée de la microbiose est bien plus longue et ininterrompue, et la maladie évolue non en 4-6 jours, mais en un temps bien plus long. Il fut démontré, par l'autopsie des animaux morts pendant l'accès [1], qu'il existe une grande différence entre le paludisme aigu et chronique. Cette différence est surtout manifeste dans *la rate*.

Dans la forme chronique, on observe une forte hypertrophie de cet organe qui a, ainsi que la moelle des os et le foie, une coloration brun noirâtre, due à la grande quantité de mélanine qui s'y trouve déposée. Par contre, dans la forme aiguë, *la rate est plutôt diminuée, elle est anémique et d'une coloration brun clair*. Ce fait démontre l'inexactitude de l'opinion, d'après laquelle l'apparition des parasites malariques provoquerait inévitablement l'hypertrophie et la mélanose de la rate.

1. C'est surtout en automne, aux mois d'octobre et de novembre, qu'on peut faire ces observations.

Une autre observation qui saute aux yeux à l'autopsie d'un oiseau mort de malaria aiguë, c'est un fort amaigrissement et une anémie générale.

Nous allons passer maintenant à l'étude du *microbe de l'infection malarique aiguë*. Il doit être distingué de celui de la forme chronique. Tous les microbes de nature animale vivant et se développant à l'intérieur des cellules sont ordinairement appelés cytozoaires, cyto-parasites ou cyto-microbes. Ces noms indiquent le lieu où ils se trouvent. En me conformant à cette nomenclature, j'ai proposé de remplacer la dénomination du plasmodium malarique de l'homme, *Hæmamœba*, en celle de *Cytamœba*. Mais comme chez *les oiseaux* le même parasite, n'étant pas mobile, n'a pas de caractère amiboïde, ce nom d'*amœba* ne peut lui être appliqué. Aussi, et surtout à cause de la propriété fondamentale du microbe de donner des spores, je l'appellerai *Cytosporon malariæ* [1].

Au début de la maladie, ce microbe apparaît à l'intérieur des globules rouges sous forme d'une toute petite tache plus ou moins claire, à contours peu précis, de la dimension de 2 à 3 μ.

J'ai pu constater dans plusieurs cas la disposition superficielle du parasite. C'était pour ainsi dire, au moment de son introduction dans le globule rouge, quand l'épaisseur de celui-ci empêchait de discerner le microbe. Le nom de *microbe accolé* de M. Laveran est parfaitement applicable à ce stade. Dans une goutte de sang, examinée après quelques heures, on voit le cytozoaire sous forme de pseudovacuole ; ses contours sont bien plus précis (fig. 1-4), sa forme est irrégulière, anguleuse, à prolongements semblables à ceux du *cytamœba* de l'homme ; quelquefois elle est arrondie, ovale. Les granulations de mélanine manquent au début, de sorte qu'il est très difficile d'observer les premiers stades du développement du *cytosporon*.

Je n'ai pu voir de mouvements amiboïdes dans aucunes conditions (températures différentes, longue durée de l'examen, solution de NaCl à 0,6 0/0 etc.) Ce n'est que rarement que je suis parvenu à remarquer des changements insignifiants de

1. On ne doit voir dans ce nom provisoire (abrégé de *Hæmocytosporon*) aucune allusion à une parenté de ce microbe avec les champignons, les monades, ou les mycétozoaires. Sa classification zoologique sera discutée plus loin.

la forme du parasite. Et cela encore après l'avoir observé pendant 10 à 20 minutes de suite à une température de 40-42° C. Je ne puis donc comparer sous ce rapport le *cytosporon* aviaire à l'hémamibe si mobile de l'homme (fig. 5). Pourtant il faut admettre la possibilité de l'existence d'un stade mobile amiboïde chez le cytosporozoaire de l'oiseau. Seulement il se peut que cet état soit très passager et qu'il ait lieu quand le microbe est encore trop petit et trop mince pour être optiquement distingué de la substance du globule rouge. Son introduction même dans l'hématie témoigne chez lui une certaine mobilité, au moins dans cette période. Car il serait tout à fait invraisemblable de supposer un englobement actif du microbe accolé par les globules sanguins. D'après cette hypothèse, la parenté entre le *cytosporon* aviaire et la *cytamœba* humaine (hémaplasmode) serait encore plus évidente.

Il a déjà été dit que dans les cas d'une forte infection le sang contenait une grande quantité de microbes. Les hématies renferment plusieurs (jusqu'à 6) pseudovacuoles : les unes sont très petites, les autres beaucoup plus grandes. J'ai même pu observer deux microbes sporulés dans une hématie. Le plus vraisemblable est donc de supposer des infections consécutives du même globule.

Il y a des cas comparativement beaucoup moins fréquents, mais bien plus intéressants et originaux ; c'est quand une hématie contient des microbes différents (fig. 23-25). J'exposerai plus loin des exemples d'une infection simultanée par le cytosporozoaire (infection aiguë) et le polimite ou *Laverania* (malaria chronique).

C'est justement dans des cas semblables de microbiose mélangée que l'on trouve dans une même hématie un cytosporozoaire sporulé à côté d'un grand cytozoaire rond — le Polimitus futur.

Dans la forme *aiguë* de l'infection malarique, les cytosporons commencent à donner des spores lorsqu'ils n'ont encore eux-mêmes que des dimensions très petites et des contours peu distincts (fig 6, 7, 13).

Dans l'infection *chronique*, les pseudovacuoles sont plus grandes, ont des contours précis ; elles sont rondes et contiennent un noyau, pas toujours bien net pourtant.

Il n'est donc pas difficile de distinguer ces deux cytozoaires

quand on est quelque peu expérimenté. Il y a pourtant encore un caractère qui facilite le diagnostic. Le cytosporozoaire est habituellement situé à un des pôles du globule sanguin, dont il rejette le noyau à l'autre pôle (fig. 13, 14, etc.) Par contre, le cytozoaire de la malaria chronique ne déplace pas le noyau, qui garde sa position normale au centre de l'hématie. Les pseudo-vacuoles de l'infection chronique sont presque toujours disposées longitudinalement à côté du noyau. Dans l'infection aiguë, l'équilibre physique et chimique de l'hématie doit être plus facilement détruit; la densité s'amoindrit et le globule infecté se déforme plus facilement; il acquiert une forme sphérique (fig. 10-12) et sa couche périphérique plus dense constitue comme une capsule, enveloppant le noyau et le parasite sporulé. Il est difficile de décider si le déplacement du noyau est dû à une cause purement mécanique (pression par le microbe mobile, peut-être) ou à une autre cause quelconque.

Une goutte de sang, examinée deux ou trois jours après la première apparition des cytozoaires, présente un aspect déjà différent. Les microbes se sont agrandis, différenciés; leur forme anguleuse s'est transformée en contours arrondis; ils contiennent déjà des granulations de mélanine.

L'examen de profil de l'hématie permet quelquefois de constater une disposition périphérique du parasite tellement accusée, que les grains de mélanine superficiels paraissent faire saillie au dehors de l'hématie vue de côté (fig. 8).

Le 3e jour on peut déjà observer la conformation caractéristique des granulations de mélanine en amas central (non diffus comme chez les cytozoaires des formes chroniques) (fig. 6).

Quelquefois l'amas de mélanine est déjà nettement différencié, tandis que les contours et la substance du microbe même ne le sont pas encore. C'est à l'amas que l'on peut alors reconnaître la présence du cytosporon au début de la sporulation. En effet, après le troisième jour, on voit apparaître des sillons à la surface du parasite (fig. 7).

Ils s'accentuent en s'approfondissant et donnent au cytozoaire l'aspect d'une *marguerite* ou d'une *mûre* qu'on appelle aussi *rosace*. Si le microbe se segmente en un nombre restreint de spores, on a la forme de marguerite (fig. 9, 18), les sillons radiaux divergent de l'amas central de mélanine.

Le nombre des spores est à peu près de 8 à 10; elles sont plus grandes que dans la forme de mûre, et ressemblent au début à une poire.

La *rosace* est semblable à une mûre et consiste en un très grand nombre de spores (15 à 20 et plus) beaucoup plus petites[1] (fig. 11, 13, 19). Le parasite occupe le tiers ou la moitié de l'hématie. Celle-ci se décolore bientôt; les spores se différencient de plus en plus, leurs liens s'affaiblissent, elles se désagrègent et se présentent libres dans le plasma (fig. 22). L'amas mélanique reste isolé avec le résidu de l'hématie détruite.

La dimension de la spore est généralement 8 fois plus petite que celle du noyau du globule rouge[2], mais il y en a de plus grandes (jusqu'à 1,5 μ). La spore contient une grande granulation, qui est évidemment le noyau. C'est surtout dans la *marguerite* qu'on l'observe.

La spore libre a une forme plus ou moins arrondie, plutôt ovale; dans la *marguerite*, c'est-à-dire avant d'être libre, elle est en forme de poire. D'après Golgi on observe la même chose dans le *cytamœba* de la fièvre quarte (hemamœba malarique de Grassi[3]).

Les spores sont assez facilement colorées par le bleu de méthylène et la safranine. Souvent on est obligé d'éloigner l'hémoglobine de l'hématie pour découvrir le cytosporozoaire formant des spores. On y arrive facilement en mélangeant de l'acide acétique faible avec le pigment.

Les spores complètement mûres, et nageant librement dans le plasma, ont l'aspect de petits corps ellipsoïdes, à contour net et un peu épaissi aux deux pôles. Le milieu de la spore est plus clair et transparent. Ce n'est qu'exceptionnellement qu'on observe les pôles en pointes. D'après l'examen microscopique, il serait à croire que la spore est faite d'une couche périphérique plus dense et plus réfringente, et d'une substance centrale moins dense, c'est-à-dire d'un ecto et d'un endoplasma.

1. Ainsi la « *marguerite* » représente une forme aplatie, et la « *rosace* » une forme sphérique.

2. Chez les oiseaux, par exemple chez le hibou adulte, le noyau de l'hématie a une longueur de 6-7 μ; une largeur de 2,5 à 3,5. La longueur de l'hématie elle-même est 14-16 μ.

3. Celli et Guarnieri (*Fortschritte der Medicin*, 1889, nos 14 et 15) ont décrit des corps de segmentation libres à flagella mobiles dans le sang de l'homme fébricitant.

Ces corps ont donc une grande ressemblance avec les spores de quelques *sporidies* (de la classe des *sporozoa*), des *sarcosporidies* par exemple. Ils ressemblent encore plus aux microsporidies, parasites du ver à soie provoquant la maladie terrible de la pébrine. Cette analogie permet de rapprocher les parasites sanguins décrits par nous des sporidies, parasites surtout musculaires [1].

Quant au sort ultérieur des spores libres (analogues aux *Schwärmersporen* des sporozoaires inférieurs), il n'existe pas encore de données bien établies ni pour celles du parasite de l'homme, ni de l'oiseau. Il est probable qu'elles s'accumulent dans la rate, la moelle des os, et, peut-être, dans les organes lymphatiques en général. De là elles peuvent de nouveau s'introduire dans les hématies, dans leurs générateurs, ou bien être englobées et détruites par les phagocytes (Metchnikoff).

Les données exposées suffisent, il me semble, pour établir la grande ressemblance entre les microbes de la malaria aiguë chez les oiseaux et de la malaria typique de l'homme. On retrouve même dans les deux cas les formes correspondantes de la *marguerite* et de la *rosace*, avec toutes leurs propriétés essentielles.

En ce qui concerne le côté pathogène, les faits rassemblés sur l'infection humaine sont plus étudiés que ceux de la malaria aviaire, pour laquelle les seules observations thermométriques qu'on possède ont été faites dans mon laboratoire.

Si on pense à la hauteur de la température normale des oiseaux, on peut admettre *a priori que leur réaction thermique envers les microbes pathogènes doit être plus faible que celle de l'homme.*

Les observations de Golgi et d'autres [2] ont démontré que, chez l'homme, la cytamœba croît et donne des spores pendant l'apyréxie. Un peu avant le frisson, les spores disparaissent du sang, elles sont probablement réfugiées dans les organes cités. Mais déjà le lendemain le premier stade du microbe intracellulaire peut reparaître, comme avant-coureur de l'accès suivant.

1. Voir ma communication « Ueber die Myoparasiten der Amphibien und Reptilien. » *Centralbl. f. Bakter.*, 1891, IX, p. 9.

2. *Arch. per le scienze mediche*, X et XIII, 1889; *Arch. ital. de Biologie*, 1890, XIV, p. 81 et 113 (aussi VIII, p. 54).

Dans la fièvre quarte, le cycle du développement et de la propagation (*marguerite*) du microbe se fait en 3 jours, entre les deux accès. Dans la fièvre tierce il se fait en 2 jours. Donc, la périodicité de la fièvre intermittente dépend du cycle de développement et de la propagation du parasite sanguin.

Quant au développement du microbe de la malaria chronique (corps en croissant de Laveran), il s'accomplit, non en un temps défini comme dans l'infection aiguë, mais dans des périodes variées suivant le sujet, ou même différentes chez le même malade (*l. c.*, 1890, p. 117).

On rencontre quelquefois chez les oiseaux fébricitants (comme chez l'homme) des cas de microbiose mélangée, c'est-à-dire qu'on trouve en même temps les microbes cellulaires de l'infection aiguë et chronique. Mais avant d'exposer ces cas, il faut se souvenir que dans *l'infection chronique, prolongée pendant quelques semaines ou quelques mois, on ne trouve pas pendant toute cette période le stade de la rosace, c'est-à-dire le Cytosporon; on retrouve dans le sang seulement le Polimitus et la Hémogregarina (Laverania) dans les diverses phases de leur développement. D'après mes recherches on n'observe les rosaces du Cytosporon que durant quelques jours.*

Par contre, dans l'infection aiguë, on peut retrouver simultanément le Cytosporon et le Polimitus.

Si avant la maladie le sang de l'oiseau était exempt de cytomicrobes, on ne trouve à son début ni Laverania, ni Polimitus *libres*. On ne voit à l'intérieur des hématies que des cytozoaires en forme de petites pseudovacuoles, en partie arrondies et en partie anguleuses. On peut s'assurer après 2 ou 3 jours que les unes donnent les marguerites ou rosaces du Cytosporon de l'infection aiguë, et les autres le Polimitus et quelquefois la Laverania. Il m'a paru que le développement des deux dernières formes demandait 5 à 6 jours depuis le début de l'infection. Pourtant, dans ces derniers temps, j'ai observé chez deux espèces d'oiseaux (le geai et le corbeau) qu'ils se développaient plus vite, en 4 jours. Par contre, chez un autre corbeau, cette période préparatoire dura pendant plus de 10 jours (il ne fut pas observé de Cytosporon dans ce cas). Je crois donc qu'on ne peut nier l'influence des propriétés individuelles des différents organismes sur la durée de la croissance et du développement des cytozoaires

sanguins. Il faut en outre remarquer que ces propriétés, surtout physiologo-chimiques, se rapportent non seulement au sang, mais aussi aux autres organes et tissus.

Dans mes travaux hémazoologiques précédents, j'ai suffisamment établi le fait que *le foyer principal du parasitisme sanguin n'était pas du tout le sang, mais qu'il fallait le chercher dans les organes générateurs du sang, dans la rate et la moelle des os. Et ceci non seulement chez les animaux à sang froid, mais aussi à sang chaud.* C'est dans les organes générateurs que les différences individuelles font valoir leur influence sur la microbiose du sang. Il est très probable que dans certains cas les premières phases du développement du Polimitus et de la Laverania se passent dans ces organes, et que ce n'est que plus tard qu'ils sont introduits dans le sang. Leur développement définitif s'y termine rapidement. Ce n'est qu'ainsi que je puis expliquer les cas dans lesquels j'ai trouvé le Polimitus libre et mobile dans des préparations du sang faites 4 jours après le début de la microbiose.

L'exposé suivant de l'histoire de la maladie de quelques espèces d'oiseaux malariques démontre que la période de *microbisme* du sang peut être suivie d'une période d'*amicrobisme*, où le sang est parfaitement exempt de parasites. Après quelque temps, plusieurs jours ou semaines, ils peuvent de nouveau reparaître sans aucune cause extérieure visible.

Les expériences faites dans mon laboratoire sur les relations de temps de la microbiose malarique, sur le cycle du développement de l'infection mixte et chronique, sur la propagation du parasite, la période d'amicrobiose, etc., ne sont pas encore terminées. Un seul fait peut être regardé comme établi, à savoir que la périodicité des symptômes généraux de la maladie correspond plus ou moins au cycle du développement des microbes sanguins.

Pour élucider les résultats cités, je crois indispensable d'exposer quelques-unes des observations typiques faites en partie par moi seul, et en partie avec le concours de M. le docteur *J. Tchouevsky*.

Il faut se rappeler que la température rectale des oiseaux étudiés oscille en moyenne entre 41,5-42,5° C. Une température

de 43° fait déjà supposer une maladie, qui devient évidente à une température au-dessus de 43°.

Corbeau A. — *Le 22 octobre.* Le sang ne contient pas de parasites. — Le 30 *octobre.* La température est de 40,8°. Les parasites sanguins apparaissent (3e jour). — 31 *oct.* L'oiseau mange peu, maigrit, son poids a diminué; le sang contient des formes sporulées et des spores libres. — 1er *nov.* T. = 42,8°; des rosaces libres de cytozoaires; forte microbiose. — 3 *nov.* T. = 42,5°. Même état. — 4 *nov.* T. = 42,8°; les cytozoaires sont de dimensions diverses; la microbiose a augmenté; les hématies contiennent de 2 à 4 cytozoaires; la quantité de globules infectés a augmenté. — 5 *nov.* T. = 42,1°; *idem;* le nombre des hématies infectées est à celui des normales comme 1 est à 10 ou 12; abrutissement, apathie. — 6 *nov.* Mort le matin. La moelle des os contient une quantité immense de microbes sanguins, notamment des Cytosporons : on ne constate ni Polimitus, ni Laverania.

Cette observation présente un cas d'infection malarique aiguë. Elle montre deux ou trois générations du Cytosporon évoluées en 10 ou 11 jours.

2. Corbeau B. — Le sang est amicrobique durant la première moitié de novembre. — 11 *nov.* On ne constate qu'un seul cytozoaire dans toute une préparation de sang. Il est grand et contient des granulations diffuses. — 15 *nov.* Apparition d'une petite quantité de pseudovacuoles de dimensions diverses. — 16 *nov.* T. = 43,1°. La microbiose a visiblement augmenté, beaucoup de cytozoaires; il y a déjà des *Cytosporons* formant des spores, des *rosaces* libres; beaucoup de Polimitus libres et développés. — Les 17, 18 et 19. Même état. — 20 *nov.* La microbiose a beaucoup diminué. On trouve encore des rosaces; T. = 43,9°. — 22 *nov.* Très peu de parasites; T. = 42,9°. — 25 *nov.* et les jours suivants, le sang est en état d'amicrobiose, les parasites ayant complètement disparu. — 4 *déc.* L'oiseau est sacrifié; le sang du cœur contient à peine 2 à 3 pseudovacuoles; il y a une quantité de phagocytes à granulations et amas de mélanine dans la rate; on trouve beaucoup plus de cytozoaires dans la moelle des os que dans le sang.

Ce cas est très intéressant, parce que c'est au laboratoire que la maladie a évolué dès son début et s'y est terminée par une guérison relative. On y observe une contradiction apparente: le 15 novembre on trouve des jeunes cytozoaires et, le 16 novembre, il y a déjà des Polimitus adultes! En admettant même que la microbiose du sang ait commencé le 14 novembre, le temps écoulé est trop court pour le développement complet du Polimitus dans le sang. Cette contradiction s'explique par le fait suivant : le cytozoaire de l'infection chronique fut trouvé déjà le 11 novembre. Donc, l'infection aiguë s'est développée du 13 au 16, ayant pour point de départ l'infection chronique (faible). La maladie a duré jusqu'au 22 novembre, au travers de 3 à 4 générations du cytosporozoaire. Cette *microbiose malarique aiguë* provoqua le développement rapide et intense des microbes de l'infection chronique, microbes qui étaient réfugiés dans la rate et dans la moelle des os. C'est de

ces foyers qu'une quantité de cytomicrobes, ou d'hématies infectées, s'introduisit dans le courant sanguin vers le 16 novembre.

L'autopsie démontre que la microbiose chronique, disparue du sang périphérique, continuait à exister dans la moelle des os. Pendant la vie de l'animal, cette microbiose paraissait à l'observateur comme latente. J'ai fait observer plus tard que nous devions accepter la même chose pour l'homme.

Pie C. — 4 *nov.* Il n'y a pas de parasites dans le sang; l'oiseau est bien portant. — 7 *nov.* Apparition des premiers cytozoaires. — 8 *nov.* Leur quantité a augmenté, ils ont grandi, mais la microbiose n'est pas forte en général. — 9 *nov.* Phénomènes de convulsion, état grave; il y a peu de parasites dans le sang, mais on y trouve déjà des *rosaces.* L'oiseau succombe le même jour. — *Autopsie :* anémie, amaigrissement, la rate est très petite; pas de mélanose; point de microbes de l'infection chronique.

Un cas semblable d'infection aiguë à cours extrêmement rapide et à issue fatale fut observé sur une autre pie *D.* La maladie dura pendant trois jours; 5 jours avant la mort le sang était encore complètement exempt de microbes; le dernier jour de la vie il contenait des cytozoaires de forme différente, des spores et des polimitus adultes.

Pie E. — Durant la fin d'octobre et la première moitié de novembre, le sang est normal. — 7 *nov.* Les cytozoaires apparaissent; mais leurs dimensions sont petites et leur nombre restreint. — 8 *nov.* Leur nombre a notablement augmenté; on trouve 2 cytozoaires dans une hématie. — 11 *nov.* Forte microbiose; les pseudovacuoles ont grandi; on trouve des cytozoaires sphériques. — 13 *nov. Idem.* — 14 *nov.* Des *rosaces;* il y en a de libres. — 15 et 16 *nov. Idem.* — 17 *nov.* Le nombre des cytozoaires a notablement diminué; on ne trouve plus de formes sporulées, de *rosaces.* — 20 *nov.* La microbiose du sang est très faible. — 21 *nov.* Un seul cytozoaire a pu être constaté sur toute une préparation du sang. — Depuis la fin de novembre le sang reste complètement exempt de microbes.

Dans ce cas nous avons affaire à une infection purement *aiguë;* l'absence du Polimitus et de la Laverania prouve que l'infection est produite par le cytosporozoaire seul et encore en petite quantité. Pourtant la présence des cytozoaires sphériques, observés le 11 novembre, prouve qu'il y a un mélange de microbes de l'infection chronique. Mais ceux-ci ne se sont pas développés définitivement dans le sang. En général ce cas n'est pas grave; on le voit à la marche de la microbiose, à l'état vigoureux de l'oiseau, à la faible perte de poids (7 *nov.* 165 grammes; 21 *nov.* 150 grammes).

Hibou F. — Bien portant en novembre. — 5 *déc.* Amicrobiose du sang; T. = 40,8°. — 10 *déc.* On ne trouve que quelques pseudovacuoles sur toute la préparation. — 11 *déc.* Beaucoup de microbes; sur 20-22 hématies normales on en trouve une infectée; jeunes cytozoaires; T. = 41,6°. — 12 *déc.*

Le nombre des microbes est devenu à peu près trois fois plus faible; cytozoaires adultes; on rencontre des polimitus à flagella très mobiles. — 13 *déc.* La microbiose du sang a notablement diminué; on ne trouve pas plus de 10 parasites sur toute la préparation; T. = 41,9°. — 14 et 15 *déc.* Même état. — 17 *déc.* Pas de parasites dans le sang; T. = 41,8°. Plus de changements ultérieurs.

Presque tout le temps l'oiseau est resté dispos; l'état maladif n'était pas appréciable; la température était normale. Évidemment il ne s'agissait que d'une *microbiose plus aiguë de la malaria chronique* qui siégeait dans les organes hématopoiétiques. Le cytosporozoaire n'ayant pas été observé, l'absence de la rosace se conçoit.

Freux G. — L'oiseau est apporté malade au laboratoire le 18 *octobre;* il est apathique, mange mal, son plumage est hérissé; le sang contient beaucoup de cytomicrobes de formes et de dimensions différentes; les pseudovacuoles sont très jeunes et non pigmentées; les plus âgées contiennent des granulations diffuses de mélanine et des amas centraux (ceux-là sont plus nombreux); cytozoaires sphériques adultes; polimitus à flagella; cytosporon produisant des spores en forme de marguerite et rosace. On observe de 1 à 4 microbes dans quelques hématies; T. = 43,2°. — 19 *oct.* Même état; poids du corps : 381 grammes; T. = 43,4°. Phénomènes convulsifs : l'oiseau tombe à la renverse et frissonne; la respiration est pénible, la bouche est ouverte. — 20 *oct.* Petite amélioration de l'état général; la microbiose du sang diminue. — 21 *oct.* Très peu de parasites dans le sang; pas de polimitus; l'état général s'améliore visiblement, T. = 42,7°. — 22 *oct.* C'est avec peine que j'ai trouvé 2 parasites dans le sang; les jours suivants ils ont complètement disparu; la température est de 42,5°. L'oiseau est vif et gai, réagit et mange bien; le poids du corps est de 410 grammes au commencement de novembre.

Le 6 *novembre* il apparaît de nouveau quelques cytozoaires à granulations de mélanine dans le sang; mais l'état général de l'oiseau reste toujours normal. Le 7 *novembre* et ultérieurement, le sang reste complètement exempt de microbes.

Ce cas présente une grave infection mixte de la malaria chronique et aiguë; on observe nettement la corrélation entre le degré de microbiose du sang, la hauteur de la température et l'état général de l'oiseau.

Corbeau J. — L'oiseau tomba malade le 11 *septembre.* Son sang ne contenait jusque-là rien d'anormal. — 11 *sept.* Assez grande quantité de très petits cytozoaires; les uns contiennent des granulations de mélanine, les autres n'en contiennent point; les pseudovacuoles sont peu visibles, peu différenciées.

Il est évident que la microbiose n'a commencé que depuis 10 à 15 heures; ce stade correspond au plasmode ou à l'hémamœba de la fièvre typique de l'homme. On remarque dans plusieurs hématies un plissement radiaire superficiel formé par les pseudovacuoles; il semble qu'on soit au premier moment de l'introduction du microbe dans la substance du corpuscule sanguin.

12 *sept.* Les cytozoaires ont notablement grandi; la quantité de granulations de mélanine a augmenté; presque partout il y a un amas central de mélanine, ce qui indique une sporulation prochaine. Et réellement on aperçoit dans quelques cytozoaires des contours onduleux et le début de sillons radiaires dirigés de la périphérie du microbe à son centre, c'est-à-dire à l'amas pigmentaire. On ne voit presque plus de petites pseudovacuoles, ce qui prouve que tous les microbes appartiennent à une même génération.

Après quelques heures on constate, par l'examen des gouttes de sang colorées par le bleu de méthylène acidulé (ou de la safranine), la présence de *marguerites* et de *rosaces*. Mais les spores ne sont pas encore complètement différenciées. L'état général de l'oiseau a empiré. — 13 *sept.* Le corbeau est mort le matin.

Autopsie. — Le *sang* contient beaucoup de jeunes microbes; il n'y a pas du tout de cytozoaires adultes et sphériques, ainsi que de Polimitus et Laverania; toutes les pseudovacuoles contiennent des amas centraux de pigment; on rencontre des rosaces libres. La *moelle des os* présente un aspect à peu près semblable à celui du sang, mais elle contient bien plus de rosaces libres et aussi des spores ovales déjà isolées, à enveloppe épaissie aux deux bouts. La *rate* est un peu agrandie, flasque, d'une coloration grise foncée. Elle contient moins de rosaces que la moelle des os.

Le cas décrit est une infection aiguë provoquée par la présence du *Cytosporon* dans le sang; les autres microbes malariques sont complètement absents.

Geai K. — 20 *sept.* Le sang contient très peu de pseudovacuoles. — 21 *sept.* Les cytozoaires sont très petits, à contours peu précis, anguleux, munis d'appendices; ils contiennent des granulations de mélanine; chez quelques-uns, le pigment est en amas au centre, indication de sporulation prochaine. — 22 *sept.* Les pseudovacuoles sont encore peu nombreuses; il y en a de jeunes; on voit au centre de quelques-unes, une tache centrale, ronde et claire (noyau?). Le cytosporon produisant des spores (marguerite) est tellement mince dans certaines hématies qu'on ne le reconnaît que grâce à l'amas de mélanine; mais on le voit très bien après avoir éloigné l'hémoglobine. On trouve en outre des *rosaces* nettement différenciées, mais la microbiose du sang n'est pas grande. On remarque dans les spores non encore différenciées (dans les pétales de la *marguerite*) une granulation, correspondant évidemment au noyau. — L'oiseau est apathique, faible et mange peu. — 24 *sept.* La microbiose du sang est à peu près la même; le nombre des hématies infectées a augmenté. L'oiseau succombe le matin de ce jour; la rate, la moelle des os, les reins, sont normaux. Les préparations étalées du foie démontrent la présence d'énormes *macrophages* (fig. 31). Leur protoplasma est granuleux et contient des lobes de hyaloplasme. Les lobes ont des mouvements amiboïdes visibles. J'ai constaté dans l'intérieur des macrophages des hématies entières englobées et non encore changées; il y en avait quelquefois trois dans un macrophage; les unes étaient normales, les autres contenaient des cytozoaires.

Évidemment la phagocytose venait de débuter, car les macrophages du

foie ne contenaient pas de mélanine; les mélanophages de la rate étaient aussi peu nombreux,

Le sang du cœur contenait non seulement des rosaces mais aussi des spores libres. Les pseudovacuoles à grains de mélanine diffus, les cytozoaires sphériques et en forme de massue, et le Polimitus étaient absents dans le sang comme dans les organes. L'oiseau avait donc succombé à la forme aiguë de la malaria.

Pie L. — Au mois de juin la microbiose du sang était bien marquée chez cet oiseau. Il y avait une quantité de cytozoaires dans les hémacytes comme dans les leucocytes (leucocytozoaires); les rosaces manquent complètement, il y a beaucoup de Polimitus; l'oiseau est abruti, son plumage est hérissé. La microbiose a notablement diminué au mois de juillet et, vers la fin du mois d'août, les parasites sanguins ont presque disparu; le sang est normal pendant la première moitié du mois de septembre; l'oiseau est vif et mange bien, son plumage est normal. Le 21 *septembre*, on ne constate que 4-5 grands cytozoaires. Au mois d'octobre, et ultérieurement, le sang reste normal. Il ne fut pas examiné au mois de janvier. Le 7 *mars* on y trouva une très petite quantité de pseudovacuoles à granulations de mélanine. Le 1er *avril* les cytozoaires sont dans le même état.

Le 4 *avril*, le nombre des hématozoaires s'est accru en grande proportion; les pseudovacuoles sont très petites, présentent des contours très nets, sont plus arrondies qu'anguleuses, et ne sont point munies d'appendices. Apparemment tous les hématozoaires appartiennent à une seule et même génération. On peut supposer que la microbiose a commencé la veille ou tout au plus deux jours auparavant. — 6 *avril*. Les cytozoaires sont devenus plus grands et présentent une longueur du tiers et même de la moitié de l'hématie. Ils sont en forme de massues, c'est-à-dire présentent des renflements à un ou à deux bouts. Les granules de mélanine se trouvent surtout réunis dans les extrémités. Sur une préparation du sang, je n'ai rencontré qu'un seul hématozoaire sphérique. — 8 *avril*. Les jeunes cytozoaires ne se rencontrent presque plus, tous étant adultes ou quasi adultes. On rencontre beaucoup de formes sphériques dans l'intérieur des hématies, et d'autres presque entièrement libres; on voit aussi beaucoup de Polimitus flagellés. — Cet état s'est prolongé pendant longtemps, ce qui a dû être produit par toute une série de générations de parasites. — Le 26 *avril* j'ai trouvé dans le sang des formes variées de cytozoaires, depuis les pseudovacuoles non pigmentées et jusqu'à des Polimitus libres. Mais pas une seule fois je n'ai pu constater la présence de jeunes cytosporozoaires ou de leur état sporulé. On voit bien que dans ce cas l'infection présentait un exemple d'une microbiose « chronique ».

Bondrée M. — Le 22 *septembre* on a trouvé dans le sang des grandes pseudovacuoles (de la malaria « chronique ») nettement délimitées, mais très peu nombreuses. — 28 *sept.* La microbiose s'est accrue; il se trouve un grand nombre de petites pseudovacuoles non pigmentées d'une forme irrégulière, anguleuse, mais présentant des contours nets. Il faut admettre que cette nou-

elle génération a envahi les hématies depuis peu de temps, depuis tout au plus un à deux jours. — 29 *sept.* La température de l'oiseau est normale, de 41,8°. Les cytozoaires sont devenus beaucoup plus grands; les granulations de mélanine sont très petites, mais en quantité habituelle, et sont distribuées irrégulièrement (la veille elles étaient encore à peine visibles). Les jeunes cytozoaires sans mélanine ne se rencontrent presque point. Les microbes ont des contours plus arrondis et présentent un aspect ovale ou vermiforme. Dans l'intérieur des pseudovacuoles, même des petites, on distingue nettement un noyau rond et clair, situé surtout dans la partie centrale (fig. 28). Un certain nombre de parasites dépassent une fois et demie la longueur du noyau de l'hématie, tandis que la plupart d'entre eux sont aussi ou même moins longs que ce noyau. Dans toutes les hématies atteintes, les noyaux ne sont pas déplacés et conservent leur situation centrale. — 30 *sept.* Les parasites ont, selon toute apparence, atteint leur état adulte; quelques-uns sont sphériques; d'autres occupent la plus grande partie de l'hématie et entourent son noyau des deux côtés. Les jeunes parasites ne se trouvent pas du tout, ce qui prouve que l'infection du sang n'a été provoquée que par une seule génération de microbes. Certaines hématies manifestent des signes évidents de désorganisation : l'hémoglobine a disparu, tandis que le noyau et le parasite sphérique restent entourés d'une capsule mince, composée de la couche périphérique de l'hématie. Sur des préparations du sang, additionné d'une solution de sel marin à 0,6 %, préparations abandonnées pendant plusieurs heures à une température de 38-40° (ou même à la température ordinaire de la chambre) on peut suivre de l'œil l'apparition de « *vermicules* » mobiles, Hémogrégarines ou *Laverania*, aux dépens de cytozoaires sphériques. Ce phénomène, qui présente un grand intérêt au point de vue purement biologique, a été pour la première fois décrit dans ma Parasitologie comparée du sang.

Le 1er *octobre* on observe des cytozoaires déjà parfaitement adultes; dans certaines hématies on trouve des parasites doubles en forme de deux corps sphériques réunis. Sous l'œil de l'observateur les cytozoaires sphériques immobiles se transforment en Polimitus avec plusieurs flagellas très mobiles. On voit ainsi que pour le développement complet des polimites il a fallu à peu près 5 jours. Les jeunes cytozoaires sont absents. L'état général de l'oiseau tout ce temps ne présente aucun signe manifeste de maladie. — 2 *octobre.* La microbiose a présenté un changement : en dehors de parasites adultes on observe encore des pseudovacuoles extrêment petites, d'une forme anguleuse et irrégulière, presque sans pigment; dans leur intérieur on aperçoit toutefois des granulations ordinaires très fines. Il est évident que *quelque part dans l'organisme il s'est produit une multiplication des microbes adultes de la première génération; il s'est formé des spores, qui ont infecté une nouvelle série d'hématies.* — T. = 41°, 6. — 3 *octobre* T. = 41°, 3. Les pseudovacuoles toutes petites ne se trouvent plus; elles ont grossi et renferment des granules de mélanine. Bref, nous voyons se reproduire la marche des phénomènes que nous avons observés dans la première génération. Cette dernière se présente sous forme de Polimitus flagellés et de Laverania vermiformes. — 4 *oct.* Beaucoup de cytozoaires, mais peu de jeunes : presque tous

sont adultes. — 8 *oct.* Il y a une nouvelle apparition de jeunes stades. On observe une transformation énergique des formes sphériques en *Laverania* mobiles avec noyau clair au milieu ; on voit à côté beaucoup de polimites, ainsi que des filaments détachés, ou pseudospirilles. T. = 41°, 4. — 12 *oct.* Nouvelle apparition de jeunes pseudovacuoles non pigmentées, à côté de microbes adultes qui existaient auparavant. T. = 41°, 5. — Au mois de novembre la microbiose a été encore manifeste, mais en janvier elle devint beaucoup moins prononcée. Pendant toute la période d'observation l'oiseau est resté vigoureux, mangeait bien, réagissait de la façon normale et paraissait en général bien portant. J'ai remarqué qu'en général les oiseaux (corbeaux, freux, choucas), attrapés à la fin de novembre, en décembre et en janvier, n'avaient point de parasites dans leur sang et se trouvaient dans un état parfait d'amicrobiose. La même règle s'applique aux oiseaux, conservés pendant tout l'hiver au laboratoire.

En avril et en mai la microbiose « chronique » réapparut chez la même bondrée dans un degré très considérable, et cependant l'état général de l'oiseau ne présente aucune altération visible.

Nous voyons donc dans ce cas un exemple très intéressant d'une *infection chronique* sans aucun concours de la part des cytosporozoaires. L'importance principale de ce cas consiste en ce qu'il démontre la périodicité de l'infection des hématies, dépendante du cycle de développement et de la reproduction des microbes. Cette périodicité se manifeste dans les infections répétées des hématies. En comparant l'état de la microbiose les 28 *septembre*, 2, 8 et 12 *octobre*, nous reconnaissons un trait commun, à savoir, l'apparition d'une nouvelle génération de cytozoaires. On peut donc admettre comme très probable que *le cycle du développement et de la reproduction de ces parasites dans l'intérieur des hématies exige une période de* 5-6 *jours à peu près.*

Dans aucune de mes observations précédentes, je n'ai eu la chance de rencontrer les stades de reproduction du Polimitus ou des grands cytozoaires avec des granules de mélanine disposés irrégulièrement. Mes tentatives pour élucider cette question à l'aide d'une étude de la rate et de la moelle des os sont restées également infructueuses. Comme seule indication d'une sporulation des cytozoaires de la malaria chronique, j'ai trouvé chez un hibou (conservé au laboratoire pendant trois ans avec une infection malarique continuelle) des contours ondulés aux cytozoaires adultes. Cependant je n'ai jamais réussi à observer la formation des spores isolées, ainsi que leur séparation du parasite. Ceci est la cause unique qui m'a empêché de me jamais prononcer au sujet de la sporulation des grands cytozoaires dans l'impaludisme chronique, ne présentant pas d'hyperthermie.

Cette lacune paraît être comblée par une communication (malheureusement trop brève) de Grassi et Feletti, d'après laquelle les *croissants* se reproduisent à l'aide de la même segmentation (formation des spores), tout à fait comme l'amibe de la fièvre typique. Ces auteurs s'expriment de la façon suivante : « Après de longues tentatives infructueuses, nous avons fini par trouver dans la rate, le foie et la moelle des os (des oiseaux) des figures, que nous sommes tentés de considérer comme des croissants en voie de segmentation [1]. Mais il ne ressort pas de cette communication avec assez de netteté, si les auteurs cités ont poursuivi la sporulation jusqu'à la fin, ou bien s'ils n'ont constaté qu'une analogie superficielle avec une hémamibe en voie de former des spores.

Les faits rapportés démontrent de la façon la plus certaine que les oiseaux sont sujets à trois formes d'impaludisme :

1° *Infection aiguë* avec hyperthermie et symptômes d'une maladie grave. La microbiose de sang est due dans cette forme à la présence du cytosporozoaire, tout à fait analogue à la cytamibe de la fièvre typique de l'homme [2].

2° *Infection chronique* sans état fébricitant manifeste. La microbiose consiste en une atteinte des hématies par les Polimitus et la Laverania (parallélisme complet avec l'homme).

3° *Infection mixte*, caractérisée par la microbiose simultanée des deux premières formes. On observe les mêmes phénomènes chez l'homme.

Ces nouvelles données établissent d'une façon tout à fait solide l'analogie de l'infection malarique des oiseaux et de l'homme, et confirment en même temps l'opinion que j'ai émise depuis plusieurs années, à savoir que *les hématozoaires sont des microbes aussi bien pathogènes pour les oiseaux que pour l'homme.* Quoique je ne me croie pas autorisé à affirmer que ces microbes soient identiques au point de vue *pathogénétique*, leur proche parenté *biologique* ne peut plus être discutée. La première question ne peut être résolue qu'à l'aide d'une infection artificielle

1. *Centralbl. für Bacter.*, IX, 1891, p. 430.

2. *Grassi* et *Feletti* (l. c. p. 405) comparent le cytosporozoaire (ou comme ils disent, l'hémamibe) des oiseaux à l'hæmamæba præcox de l'homme. Chez les oiseaux (moineau et pigeon) ils n'ont jamais vu d'infection typique avec la seule hémamibe, sans le concours des croissants. Ils considèrent ce fait comme une réfutation de l'opinion de ceux qui, comme *P. Canalis*, voient dans l'hémamibe une première période de l'infection par les croissants.

de l'homme avec les hématozoaires des oiseaux et réciproquement. Je n'ai pas encore eu l'occasion de faire de semblables expériences. D'après la littérature, nous ne savons à ce sujet que les tentatives de *M. Laveran* pour infecter des oiseaux avec le sang malarique de l'homme (injecté dans les veines), tentatives qui n'ont pas abouti. Cette question doit être encore poursuivie plus loin; dans mon laboratoire j'ai fait, en collaboration avec *M. Tchouersky*, une série d'expériences sur l'infection artificielle des oiseaux bien portants avec le sang des oiseaux malades. Nos résultats promettent une solution de ce problème dans le sens positif.

La question de la place des hématozoaires malariques dans le système zoologique présente de grandes difficultés. Elle ne peut être suffisamment abordée que par des spécialistes compétents dans cette branche de la biologie. Jusqu'à présent les opinions sur ce sujet sont divisées. Plusieurs auteurs insistent sur la parenté de l'hémamibe de l'homme avec les zoospores des Monadinées (Paltauf) [1]. Chez ces dernières, comme on peut en juger d'après l'exemple de la Pseudospora, la reproduction se fait de la façon suivante : l'organisme s'enveloppe d'une membrane cystique et concentre les résidus nutritifs dans le centre du cyste (présentant une analogie avec les granules de mélanine réunis dans la partie centrale), après quoi le protoplasma se segmente en plusieurs zoospores, qui se différencient et s'éloignent les unes des autres. La parenté des microbes malariques avec les Myxomycètes avait été déjà admise par Celli et Guarnieri. Metchnikoff les range parmi les Sporozoaires en général et les Coccidies en particulier. Un des arguments principaux en faveur de cette opinion peut être fourni par leur genre de vie dans l'intérieur des cellules animales. Je peux invoquer encore le fait que l'hématozoaire de la grenouille, appartenant sûrement au groupe des Coccidies, se reproduit dans l'hématie en passant par un stade de *marguerite* tout à fait semblable à celui du microbe malarique (observations personnelles, ainsi que celles de W. Kruse) [2].

1. *Wiener Klin. Wochenschr.*, 1890, N. 2-3.

2. Dans un de mes articles j'ai déjà proposé la formation d'un groupe particulier, désigné par le nom de *Hæmosporidia*. Nous trouvons une indication dans le même sens chez Celli.

Grassi insiste sur son opinion, que les microbes malariques appartiennent à la classe des Rhizopodes, ou au moins sont tout à fait voisins de ces organismes. Il les range parmi les Amibiens (*sensu lato*), et pense même qu'une amibe, trouvée dans des marais, pourrait être le véritable parasite malarique. On ne peut pas se prononcer sur la valeur de cette hypothèse, ainsi que d'autres encore énoncées par M. Grassi, avant l'apparition de son mémoire détaillé. M. Kruse [1] étend la dénomination générique de Hæmogregarina que j'ai introduite, et admet toute une famille de Hæmogrégarinides, dans laquelle il range les parasites malariques de l'homme et des oiseaux sous les noms de *Hæmoproteus Danilewskii* (oiseaux) et de *Plasmodium malariæ Celli* et *Marchiafava* (homme).

Je considère encore comme prématurée la question de l'identité ou de la pluralité des parasites de toutes les infections malariques. Mais pour orienter le lecteur sur les opinions courantes à ce sujet, je citerai l'avis de MM. Grassi et Feletti, qui considèrent l'*Hæmamœba* et la *Laverania* comme deux genres distincts. Ils admettent en dehors de cela trois variétés de l'hémamibe, qui correspondraient aux différents cycles des phénomènes pathologiques et du développement des microbes. Comme preuve ils invoquent les expériences d'infection artificielle de l'homme avec du sang malarique; dans ces cas l'homme inoculé prend la fièvre du même type que celle de l'individu qui a fourni le sang [2]. Dans ces derniers temps, *Golgi* [3] incline de plus en plus à admettre une proche parenté des différentes formes du microbe malarique de l'homme, et accepte même le passage de ces formes l'une dans l'autre. Ainsi il pense que l'état flagellé se transforme en croissant, et que les jeunes stades de ce dernier peuvent se présenter comme le microbe de la fièvre intermittente typique. Celli et Guarnieri ont observé directement le passage des *croissants* aux formes sphériques et flagellées. Bignami et Bastianelli ont émis l'opinion très ori-

1. *Archives de Virchow*, t. 121, p. 371.

2. V. le travail de Gualdi et Antolisei, *Riforma medica*, novembre 1889. Les observations de C. Terni et G. Giardina sur la fièvre atypique sont également citées comme preuve de l'existence de 3 espèces (ou variétés) indépendantes du parasite malarique de l'homme (*Arch. ital. de Biologie*, 1890, XVI, p. 157).

3. *Arch. ital. de biologie*, 1890, XIV, p. 122, 124; v. aussi les *Beitrage de Ziegler*, 1890, IV.

ginale, que les croissants et les polimites (Laverania *Grassi*) ne sont que des formes de dégénérescence de l'hémamibe. D'après Bignami les croissants seraient incapables d'un développement progressif ainsi que de reproduction [1].

J'ai énuméré ici toutes ces opinions contradictoires dans le but de prouver le peu de solidité des déductions tirées uniquement des observations sur l'homme. On voit bien quel concours précieux peut être fourni par l'étude de l'impaludisme des oiseaux. Je dois rappeler ici que, d'après mes recherches antérieures, l'*Herpetomonas Lewisii*, qui vit et se reproduit comme une monade indépendante, n'est en réalité qu'un état de développement du flagellé bien connu, *Trypanosoma sanguinis*, qui atteint son stade définitif dans le sang des poissons, des grenouilles et des oiseaux. On rencontre des phénomènes analogues aussi chez d'autres Protozoaires. Des faits semblables doivent nous rendre très prudents dans l'acceptation des différentes formes du microbe malarique comme des genres ou des espèces distincts. Il serait donc prématuré de se prononcer contre la probabilité de l'hypothèse « unitaire » d'après laquelle toutes les formes du microbe malarique ne présenteraient que des états différents d'un seul et même organisme [2]. De mon côté, je ne puis qu'exprimer mon adhésion à cette hypothèse, qui rend compte de tous les faits si variés. L'apparente fixité des formes, telles que les Hémamibes, Polimites, Laverania, ainsi que leur différenciation dans l'organisme malade, n'excluent nullement la possibilité de leur origine commune d'un seul et même microbe générateur, existant librement en dehors de l'organisme. Peut-être pourrait-on admettre que même la microbiose du sang des grenouilles, des lézards et des reptiles rentre dans le groupe étendu de l'infection malarique. En faveur de cette déduction, je pourrais citer un grand nombre de faits, constatés dans mes recherches hématologiques antérieures (par exemple l'analogie entre les *Drepanidium*,

1. *Atti della R. Accad. Medica di Roma.* S. II, t. V ; *Centr. f. Bacteriol.*, *IX*, N. 8, p. 283.

2. M. Laveran s'est encore exprimé dans le même sens, dans les *Arch. de médec. expér.*, 1890, N. 1.

Hæmogregarineæ, *Laverania*, etc.), que je me réserve d'analyser dans un autre article [1].

Au point de vue de l'hypothèse unitaire de l'infection malarique on pourrait proposer le rapprochement suivant des diverses formes du parasite, sans entrer pour cela dans la discussion de sa place dans le système zoologique :

Cytozoon malariæ (α) *hominis* (β) *avium*	*Cytozoon præcox* s. *Cytosporon*	(a) *Hæmamœba* = *Cytamœba* (b) *Cytosporon avium*
	Polymitus (c	
	Laverania	(d) *Hæmogregarina avium* (e) *Laverania hominis*

On peut maintenant se poser la question suivante : si ces microbes sont vraiment pathogènes et occasionnent l'accès fébrile, en quoi consiste le mécanisme de leur action? Il est indiscutable que l'impaludisme est un cas d'une *infection ectogène*. Ses provocateurs, les microbes, se trouvent en dehors de l'organisme dans le sol, dans l'eau. De là seulement ils pénètrent dans l'organisme où ils peuvent agir directement, d'une façon *chimique*, au moyen d'une toxine qu'ils élaborent dans leur propre protoplasma ou bien dans le milieu qui les nourrit. Dans ce cas il faudrait envisager, au point de vue téléologique, les symptômes fébriles (notamment les phénomènes vasomoteurs et l'hyperthermie) comme un moyen de défense, adapté dans le but d'éloigner la cause morbifique. Mais d'un autre côté on n'a aucun droit de renier *a priori* l'hypothèse *mécanique*, d'après laquelle les microbes agiraient en s'introduisant d'une façon active dans les cellules des centres nerveux. Une excitation semblable des cellules du bulbe rachidien pourrait également provoquer une réaction générale de la part de l'organisme entier.

On pourrait citer encore plusieurs autres théories de la fièvre, en les reliant avec les microbes du sang; mais ce serait inutile, parce que l'on voit bien sans cela que l'acceptation des parasites protozoaires comme cause de l'impaludisme ne présente aucune difficulté pour une théorie rationnelle de la fièvre.

1. Dans ce mémoire projeté, je me propose aussi de présenter la critique des résultats si intéressants de Celli et Sanfelice (*Annali dell' Ist. d'Igiene*, N. S., V. I, Fasc. 1) et de L. Pfeiffer (*Die Protozoen als Krankheitserreger*, 2e édit. 1891).

PLANCHE XIX

EXPLICATION DES FIGURES

(Dans toutes les figures *n* signifie le noyau de l'hématie.)

Parasites des oiseaux.

Fig. 1, 2, 3, 4. — Les plus petits cytozoaires en forme de pseudovacuoles; les figures 2, 3 correspondent à une infection intensive.

Fig. 5. — Changements de forme du cytozoaire *a* sous l'influence du chauffage à 39-40° pendant 12-15 minutes. Passage de *a* en *b*.

Fig. 6. — Un cytosporozoaire dans l'infection malarique aiguë, 1 à 2 jours après l'attaque de l'hématie.

Fig. 7. — Le même un jour plus tard; la forme marguerite est plus marquée.

Fig. 8. — Le même microbe vu de profil.

Fig. 9, 10, 11. — Sporulation avancée du cytosporozoaire; l'hémoglobine a été éloignée à l'aide d'un acide faible.

Fig. 12, 13, 14, 15. — Diverses formes du cytosporozoaire en voie de sporulation.

Fig. 16, 17, 18, 19, 20. — Un sporozoaire dénudé, en partie avec des restes de l'hématie (18, 20); la figure 18 présente une forme très nette de la « marguerite ».

Fig. 21. — Un globule de sang entièrement rempli par les spores du cytosporozoaire (un leucocytozoaire?).

Fig. 22.—Spores mûres du cytosporozoaire libre dans le plasma sanguin.

Fig. 23, 24, 25, 26. — Infection mixte des hématies par le cytosporozoaire et le microbe de l'infection chronique.

Fig. 27. — Un cytosporozoaire en voie de sporulation et en forme d'éventail (voir fig. 47, ainsi que *P. Canalis. Fortsch. d. Medic.*, 1890, n° 9).

Fig. 28, 29, 30. — Un cytozoaire de l'infection chronique avec un noyau visible chez le vivant (Cf. les hématozoaires des animaux à sang froid).

Fig. 31. — Un macrophage du foie de geai.

Fig. 32. — Cytozoaire sphérique de l'infection chronique (Laverania ?); *x*, petit corps muni en apparence de contours doubles.

Fig. 33, 34. — Hématies, transformées en cytocystes, remplies de corps brillants fusiformes (spores?); dans la figure 34, en dehors de ces corps, on en aperçoit d'autres très petits et mobiles.

Fig. 35. — Un cytocyste du sang analogue au précédent, mais sans corps fusiformes, rempli de liquide et de très petits corps recourbés semblables à ceux de l'infection chronique (v. ma *Parasitologie comparée du sang*, I, 1889, p. 27. Pl. I, fig. 12, 13).

Fig. 36. — Une rosace d'un rein raclé.

Fig. 37, 38, 39. — Psorospermose des hématies? Sphères granuleuses et opaques (cytocystes) du rein et de la moelle des os.

Fig. 40. — Stade plus avancé, en forme de framboise; commencement de la segmentation.

Fig. 41. — Différenciation ultérieure des germes en forme de croissant de l'Hemogregarina Avium (identique avec une Laverania solitaire, se développant dans l'hématie).

Fig. 42. — Un cytocyste rempli de germes entièrement développés (v. fig. 48 et 50, ainsi que les parasites des tortues).

Fig. 43. — Le cyste est écrasé et laisse échapper des germes mobiles (les formes des fig. 37-43 ne se rencontrent que chez les oiseaux qui en même temps renferment dans le sang, la moelle des os, et dans d'autres organes, les cytozoaires malariques. Le même fait se rapporte, à ce qu'il paraît, également aux corps des fig. 33, 34 et 35).

Fig. 44. — Des jeunes hémogrégarines (ou Laverania) de la rate.

Fig. 45. — Une Laverania, qui s'est formée sous mes yeux aux dépens d'un hématozoaire sphérique (v. fig. 43, 44, 46, 49).

Hémoparasites de la grenouille.

Fig. 46. — Hémogregarina (Drepanidium) jumeaux, qui se sont développés aux dépens des pseudovacuoles.

Fig. 47. — Sporulation intracellulaire d'un cytozoaire « amiboïde » (Hemogregarina) en forme d'un « éventail » ou d'une « rosace » (v. fig. 12, 27 et autres

Fig. 48. — Un cyste avec des germes en forme de croissant, puisé dans le rein.

Fig. 49. — Drepanidium libres mobiles dans le sang.

Parasites des lézards.

Fig. 50. — Un cytocyste (du sang) avec des germes de l'hémogrégarine; des cystes analogues se retrouvent dans les reins et la rate.

a
b
n
n
n
n
n
c
n
n
n
n
n

REVUES ET ANALYSES

SUR LA CONSTITUTION DES MATIÈRES ALBUMINOÏDES

REVUE CRITIQUE

Hlasiwetz et Habermann, *Ann. d. Ch. und Pharm.*, t. CLXIX, p. 150 et 304. — P. Schutzenberger, *Ann. de ch. et de Physique*, 5e S., t. XVI, et *Comptes rendus*, t. CXII, p. 198. — Salkowski, *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. XII, p. 215. — O. Loew, *Journal f. prakt. Chemie*, 2e S., t. XIII, p. 129. — L. Liebermann, *Maly's Jahresber.*, t. XVII, 8. — Le Nobel, *Ibid.*, 3. — C. Wurster, *Ibid.*, 4. — Hofmeister, *Zeitschr. f. phys. Chemie*, t. II, p. 228. — Grimaux, *Comptes rendus*, t. XCIII, p. 771; t. XCVIII, pp. 105, 231, 1336, 1434, 1485, 1540 et 1578, et *Bulletin de la Soc. chimique*, t. XII.

Les travaux résumés dans notre dernière revue nous ont amenés en face d'une question difficile. Nous avons vu que les diverses matières albuminoïdes présentaient, au milieu de ressemblances profondes qui obligent à les ranger dans un même groupe, des différences de composition élémentaire qui empêchent de les croire identiques. Nous avons en outre appris que leur molécule était très compliquée, comprenait en tout plusieurs milliers d'atomes. Ces atomes doivent être arrangés suivant un plan commun, pour expliquer les ressemblances entre les diverses matières albuminoïdes. Ils doivent pouvoir subir des variations de nombre ou de situation, pour expliquer les différences. Nous voilà donc placés devant des questions de *structure atomique*.

Ces questions, fort étudiées dans la chimie moderne, sont un peu des *questions de foi*, et c'est pour cela qu'elles passionnent les initiés, tandis qu'elles laissent indifférents ceux qui estiment qu'on ne doit croire qu'aux faits nettement démontrés, et encore avec réserves. Elles se défendent en outre contre la curiosité par un aspect rébarbatif et hérissé, dont elles gagneraient à se dépouiller, parce qu'elles ne mettent au fond en jeu que des idées très simples. Ces idées, au moins les principales, sont nécessaires à dégager, si nous voulons bien comprendre ce dont nous avons besoin au sujet des matières albuminoïdes.

I

Parmi les notions de structure atomique, les plus simples, celles qui expliquent le plus de faits et en ont jusqu'ici fait découvrir le plus de nouveaux, reposent sur la notion de l'*atomicité*. Dans l'eau H^2O, il y a deux atomes d'hydrogène et un d'oxygène. Des deux atomes d'hydrogène, un peut être remplacé par du potassium, de façon à donner l'hydrate de potasse KHO. Si l'autre atome d'hydrogène est remplacé de même, on a la potasse anhydre K^2O. L'oxygène de l'eau ne peut pas être remplacé par moitié. S'il l'est, il l'est entièrement, par exemple par un atome de soufre, qui avec l'hydrogène donne l'hydrogène sulfuré H^2S, et avec le potassium le sulfure K^2S. Nous pouvons, *par convention*, traduire ces faits en disant que l'hydrogène, le potassium, sont monoatomiques; l'oxygène, le soufre, biatomiques.

De même l'azote, le phosphore, peuvent être dits triatomiques, parce que dans l'ammoniaque AzH^3, par exemple, l'hydrogène peut être remplacé par tiers, tandis que l'azote est toujours remplacé intégralement; enfin, le carbone, le silicium sont tétratomiques, parce que dans le gaz des marais CH^4, il y a quatre atomes d'hydrogène dont chacun peut être remplacé par un atome de chlore, corps monoatomique, tandis que le carbone ne peut être échangé qu'en bloc, et contre un atome d'un corps tétratomique, ou deux atomes biatomiques.

Une manière schématique simple de se représenter ces faits est de figurer l'atome monoatomique par un point, l'atome biatomique par une ligne, l'atome triatomique par une étoile à 3 pointes, l'atome de carbone par une croix. Il y a deux atomes d'hydrogène aux deux extrémités de l'atome linéaire d'oxygène, trois aux trois pointes de l'atome d'azote, quatre aux quatre extrémités de la croix du carbone. Les corps obtenus, eau, ammoniaque, gaz des marais, sont dits *saturés*. Ils ne peuvent s'agréger d'autres atomes qu'en perdant ceux qu'ils possèdent déjà. Ils ne peuvent subir que des *substitutions*. Ce sont deux substitutions successives qui ont transformé H^2O d'abord en KHO, puis en K^2O.

Réciproquement le groupement atomique HO, où il y a une *atomicité* libre à une des extrémités de l'atome linéaire d'oxygène, peut être considéré et se comporte en effet comme un groupement monoatomique. On l'a même jugé digne de recevoir, à raison de ce fait, un nom spécial : on l'appelle *oxyhydrile*. De même le groupement atomique AzH^2 est monoatomique et porte, nous verrons bientôt pourquoi, le nom d'*amidogène*. Le groupement CH^3 est aussi monoatomique pour la

même raison, et peut, par exemple, se souder à un atome de chlore pour donner le corps CH^3Cl, ou à l'oxyhydrile OH pour donner le corps $CH^3.OH$ qui est l'alcool méthylique.

Mais il y a plus, et ici nous touchons non pas à la cause, mais à une explication ingénieuse de la fécondité de la chimie organique : ces deux groupements CH^3 monoatomiques peuvent se souder entre eux, de façon à donner naissance à un groupement plus complexe, l'éthane $CH^3.CH^3 = C^2H^6$. Deux croix du carbone, ayant chacune une extrémité libre, se sont soudées par cette extrémité, et ont donné naissance à un nouveau groupement saturé, puisque chaque pointe libre porte son atome d'hydrogène.

Ce même groupement C^2H^6 pourra, en perdant un atome d'hydrogène, se transformer à nouveau en groupement monoatomique $C^2H^5 = CH^3.CH^2$. L'atome de carbone terminal n'a que trois de ses pointes occupées, l'une par le groupement voisin CH^3, les deux autres par deux atomes d'hydrogène; il y en a donc une libre à laquelle on pourra souder un nouveau groupement CH^3, de façon à faire le corps

$$CH^3.CH^2.CH^3$$

où nous mettons des points pour séparer les groupes comprenant un atome de carbone. Ce corps est ce qu'on appelle le *propane*.

Ici, la question, je ne dirai pas se complique, car ce sont toujours les mêmes principes qui sont en jeu, mais exige un peu plus d'attention, car nous allons y voir apparaître la question de l'*Isomérie*. Les quatre atomes du méthane CH^4 sont identiques, et rien ne les distingue l'un de l'autre. Il en est de même des six atomes d'hydrogène de l'éthane $C^2H^6 = CH^3.CH^3$, où chacun des atomes de carbone, uni à son voisin par une atomicité, porte trois atomes d'hydrogène. Il n'en est plus de même pour le propane $CH^3.CH^2.CH^3$, où les atomes de carbone placés aux deux extrémités de la chaîne portent chacun leurs trois atomes de carbone, tandis que celui du milieu n'en porte que deux. On comprend de suite qu'il *peut* ne pas être indifférent que l'atome d'hydrogène que nous pouvons remplacer par une molécule monoatomique CH^3 pour passer au terme supérieur au propane, que cet atome d'hydrogène, disons-nous, soit emprunté à l'atome central, ou à l'un des atomes des deux extrémités. En écrivant suivant nos conventions, la représentation schématique des deux corps nouveaux qui résultent de cette soudure, en deux points différents, de la molécule CH^3 à la place d'un atome d'hydrogène, on voit qu'il *peut* y avoir deux corps différents

$$CH^2.CH^2.CH^2.CH^3 = C^4H^{10}$$

et

$$\begin{array}{c} CH^3 \\ \cdot \\ CH^2.CH.CH^3 = C^4H^{10} \end{array}$$

Or il existe deux corps ayant pour formule C^4H^{10}, différant entre eux par leur point d'ébullition et d'autres caractères. Il est impossible de n'être pas frappé de cette coïncidence, qui du reste n'est pas un fait isolé, et qui se retrouve partout. Les *isoméries* prévues se retrouvent toujours par l'expérience. A mesure même que le degré de complication de la molécule augmente, on voit augmenter aussi, et dans une proportion beaucoup plus rapide, le nombre des isomères divers qu'on *peut* obtenir, en accrochant en un point ou à l'autre une molécule CH^3 à la place d'un atome d'hydrogène, et le nombre des isomères que révèle l'expérience reste toujours voisin du nombre théorique, jamais supérieur, mais souvent égal. Sans qu'il soit besoin d'entrer dans le détail, on voit apparaître ici l'*isomérie de position*. Des corps ayant la même composition chimique peuvent être différents dans leur constitution, et dans la position des atomes qui forment la molécule. Il est entendu que cette position, nous ne la connaissons pas, que toutes les images que nous nous en faisons sont des images sans doute grossières, et c'est pour cela qu'il n'est pas nécessaire de pousser plus loin l'exposition d'une théorie dont la destinée est d'être caduque comme toutes les théories. L'important est d'avoir vu que cette théorie nous fait prévoir des isoméries de position, que l'expérience retrouve, au moins en partie.

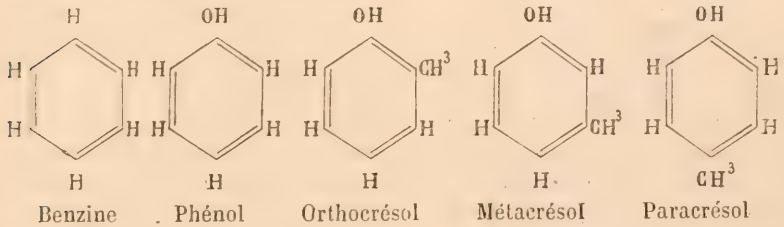
La série des carbures dérivés de CH^4, carbures dont chacun diffère de celui qui le précède par l'interposition d'un chaînon nouveau CH^2, porte le nom de *chaîne saturée de la série grasse*, parce que de chacun de ces carbures d'hydrogène on peut faire dériver l'acide correspondant, dont la série est celle des acides gras. Il est bien entendu que de même qu'il y a des isoméries dans les carbures saturés, il y en a aussi, et de bien plus nombreuses, dans la série des alcools, des acides gras, etc.

II

Cette chaîne se présente à nous, d'après le mode de représentation schématique que nous avons adopté, comme une chaîne ouverte, ayant au moins deux extrémités, et pouvant en avoir davantage, dans le cas de la soudure de maillons latéraux en un point de la chaîne centrale. A côté de ces chaînes ouvertes, et en suivant le courant d'idées qui lui a appris à les construire, la science a appris à imaginer des chaînes fermées, dont la plus connue est la chaîne de la benzine C^6H^6. Ce corps, envisagé suivant nos idées de tout à l'heure, n'est pas un carbure saturé. Il lui faudrait pour cela 14 atomes d'hydrogène, à savoir 6 pour les deux atomes de carbone des extrémités de la chaîne, et 8 pour les 4 atomes intermédiaires. Au lieu de 14, il n'y en a que 6, et pourtant la benzine se comporte, dans un grand

nombre de réactions, comme un corps saturé, ne pouvant se combiner par exemple à un atome de chlore qu'à la condition de perdre au préalable un atome d'hydrogène que le chlore vient remplacer. On donne de ce fait une représentation schématique en se figurant les six atomes de carbone comme constituant une chaîne fermée dans laquelle chacun des atomes est relié par deux atomicités à l'un de ses voisins, par une seule à l'autre, de façon que tous ces atomes soient identiques les uns aux autres par leurs attaches dans la chaîne, et gardent chacun une atomicité libre à laquelle est accroché un atome d'hydrogène. On a ainsi le groupement C^6H^6, groupement fondamental de la série de la benzine ou *série aromatique*. Dans le mode de représentation graphique que nous avons signalé plus haut, il faut se représenter chacune des croix du carbone comme liée par deux branches aux deux branches de la croix qui précède, par une branche à la croix qui la suit; une pointe reste, qui est occupée par un atome d'hydrogène.

Remplaçons cet atome d'hydrogène par une molécule d'oxyhydrile OH, nous transformons la benzine en phénol, et comme tous les atomes d'hydrogène sont identiques dans notre conception, peu importe celui qui subira la substitution. Mais il n'en va plus être de même si, en outre de cette substitution, nous en produisons une autre. Si nous remplaçons par exemple une nouvelle molécule d'hydrogène par un groupement monoatomique CH^3, le corps qui était auparavant du phénol C^6H^5 OH, devient maintenant du crésol $C^6H^4.CH^3.OH$, et on comprend qu'il *peut ne pas être* indifférent que la molécule d'hydrogène qui subit la seconde substitution soit voisine ou éloignée de celle qui a subi la substitution par le groupe hydroxyle. En représentant schématiquement par un hexagone la figure du noyau benzinique, on suit bien, sur les figures suivantes, la transformation de la benzine en phénol, et on voit que celle-ci faite, il y a trois places différentes à donner au groupement CH^3 qui amène la transformation en *crésol*. Ce sont les 3 angles de droite de l'hexagone. Ceux de gauche ne donneraient rien de nouveau, car il suffit de regarder les groupements à revers, pour retrouver ceux qui sont dessinés.



Benzine Phénol Orthocrésol Métacrésol Paracrésol

Or, en présence de ces trois modes de groupement théoriquement possibles, et *peut-être* différents, l'expérience montre trois crésols ayant

des températures d'ébullition et des propriétés diverses avec une parfaite identité dans la composition élémentaire, et pour les distinguer, elle les a nommés ortho, méta, et para-crésol. La corrélation entre le nom et le groupement moléculaire est tout à fait arbitraire, car, je le répète encore, nous ne savons rien sur la position exacte des atomes; mais, pour s'entendre, les chimistes ont admis que les substitutions se faisaient sur deux atomes voisins dans les corps portant la préfixe *ortho*, sur deux atomes non contigus dans les corps à préfixe *méta*, sur deux atomes placés à deux points opposés de l'hexagone pour les corps *para*.

Voilà donc une nouvelle isomérie de situation, qui n'est pas au fond très distincte de la précédente, mais qui s'ajoute à elle pour multiplier le nombre possible des combinaisons de même formule brute, et de composition atomique différente. On comprend, en effet, sans qu'il soit besoin d'insister, qu'à chacune de ces positions ortho, méta et para peut venir s'accrocher, en perdant un de ses atomes d'hydrogène et en s'y substituant à l'un de ceux de la benzine, l'un des carbures saturés de la série grasse; d'où une série d'isoméries nouvelles, formées de la combinaison des isoméries autour du noyau hexagonal de la benzine, et des isoméries des chaînes de la série grasse. A côté de ces isoméries, il faut faire entrer celles qui proviennent de ce que la molécule de benzine peut subir plus de deux substitutions. En remplaçant dans le crésol

$$C^6 H^4 . CH^3 . OH$$

un nouvel atome d'hydrogène par un groupement CH^3, on a le xylol

$$C^6H^3 . 2CH^3 . OH$$

qui est isomérique avec le produit de la substitution, dans C^6H^5OH, d'un atome d'hydrogène par le groupement monoatomique C^2H^5, donnant l'éthyl-phénol

$$C^6H^4 . C^2H^5 . OH.$$

Bref, nous avons ouvert la porte, par ces considérations théoriques toujours appuyées de l'expérience, à une foule de corps isomères, et nous aurons terminé l'étude générale des notions dont nous avons besoin pour comprendre les travaux faits sur les matières albuminoïdes, si nous ajoutons les considérations suivantes.

En groupant par la pensée quatre angles consécutifs de l'hexagone de la benzine, et en les séparant des deux qui restent, on obtient une chaîne ouverte $C^4 H^4$ dont les extrémités libres peuvent être rejointes par un atome d'un corps biatomique ou triatomique. En les rejoignant par un atome de soufre on a le *Thiophène* $C^4 H^4 S$, corps jouant à peu près le même rôle de radical saturé que la benzine, et auquel on peut

rattacher l'explication d'une partie du soufre que contiennent toujours les albumines. En fermant la chaîne par un atome d'azote, on a le *Pyrrol* $C^4 H^4 Az$, pouvant jouer aussi le rôle de noyau que joue la benzine, et que nous allons retrouver.

III

Les recherches faites pour remonter à la connaissance de la matière albuminoïde, connaissant celle de ses produits de décomposition, sont déjà anciennes. On en doit surtout une série importante à MM. Hlasiwetz et Habermann, mais c'est surtout entre les mains de M. Schutzenberger qu'elles ont pris une tournure méthodique et féconde.

Quand on les réduit à leurs lignes principales, les belles recherches de M. Schutzenberger prennent une physionomie très simple. En traitant en vases clos, l'albumine de l'œuf par l'hydrate de baryte à 200°, on la dédouble en un certain nombre de groupements plus simples, que l'on sépare par les procédés de l'analyse immédiate, et dont l'ensemble, représentant le résultat de la dislocation d'une molécule complexe de matière albuminoïde, peut servir à la reconstituer par la pensée. Il suffit de ramasser ces morceaux, de les affronter par les faces de fracture, pour rétablir l'édifice initial. Ceci revient à dire, en langage de chimiste, qu'il faut étudier la structure atomique des produits de dislocation de l'albumine, chercher de quel carbure d'hydrogène ils dérivent, découvrir leurs atomicités disponibles, qui sont les points de soudure par lesquels on peut les rapprocher pour les raccrocher les uns aux autres. Il est rare, il est vrai, que, pendant la dislocation, il y ait de ces atomicités qui deviennent libres. D'ordinaire l'eau $H^2 O$ intervient, et fournit un atome d'hydrogène et une molécule d'oxyhydrile OH, lesquelles s'accrochent aux deux atomicités soudées antérieurement et que la dislocation a séparées. Mais cela n'est pas embarrassant pour le chimiste, qui sait d'ordinaire faire abstraction de ce phénomène ; c'est ainsi que l'hydratation qui se produit pendant le dédoublement d'un corps gras en acide gras et en glycérine ne l'empêche pas de voir comment les deux corps sont unis dans le corps gras. Ce phénomène d'hydratation ne pouvait pas faire défaut pendant la destruction de la matière albuminoïde, et il y est même très important, car M. Schutzenberger a trouvé que 100 grammes d'albumine en se décomposant à 200°, absorbaient $17^{gr},6$ environ d'eau, ce qui fait plus de 50 molécules. Il y a donc probablement un grand nombre de produits de dédoublement, puisqu'il y a tant de lignes de fracture.

Parmi les corps produits, on trouve naturellement un certain

nombre de groupements, stables parce qu'ils sont de composition simple, et dont l'existence ne saurait surprendre. Ce sont les acides carbonique, oxalique et acétique qui entrent en combinaison avec la baryte, l'ammoniaque, dernier terme de la décomposition des corps azotés, un peu d'hydrogène gazeux. Si ces produits représentaient une fraction notable du poids de l'albumine employée, nous aurions dépassé le but, nous aurions disloqué trop à fond l'édifice moléculaire à étudier, nous l'aurions réduit en morceaux trop fins pour qu'on puisse songer à les utiliser pour une reconstruction. Mais l'ensemble de ces corps représente moins de 20 0/0 du poids de l'albumine employée, et c'est dans le résidu que se trouvent les produits de dislocation les moins émiettés, et par conséquent les plus intéressants.

Près de la moitié de ce résidu est formé d'acides gras amidés, c'est-à-dire des produits qu'on obtient quand, dans un acide gras, dérivé d'un carbure saturé, on remplace un atome d'hydrogène par une molécule d'amidogène AzH^2. L'acide acétique a par exemple pour formule $CH^3.CO^2H$. L'acide amidoacétique ou glycocolle aura pour formule $CH^2.AzH^2.CO^2H$, et il est intéressant de le retrouver parmi les produits de l'attaque des albuminoïdes par la baryte, car on sait qu'il forme un des principaux constituants de l'urine des herbivores. C'est lui qui, avec l'acide benzoïque, donne l'acide hippurique. Le glycocolle n'est pas le seul terme de la série des acides amidés, car on retrouve dans le résidu les cinq termes suivants :

Acide	amidoacétique ou glycocolle...	$CH^2.\ AzH^2.\ CO^2H$
—	amidopropionique au alanine...	$C^2H^4.\ AzH^2.\ CO^2H$
—	amidobutyrique ou butalanine...	$C^3H^6.\ AzH^2.\ CO^2H$
—	amidovalérique	$C^4H^8.\ AzH^2.\ CO^2H$
—	amidocaproïque ou leucine.....	$C^5H^{10}.\ AzH^2.\ CO^2H$

On trouve là cinq termes consécutifs de la série homologue, dont les formules mettent en évidence l'analogie de constitution. Ce sont les trois derniers qui sont les plus abondants, et on peut les rassembler sous le nom commun de *leucines*, et leur attribuer la formule générale $C^n\ H^{2n+1}\ AzO^2$, où n varie de 4 à 6. Leur formation sous l'action de la baryte prouve l'existence, dans la molécule albuminoïde, de chaînes grasses, probablement assez longues, puisqu'il en reste des fragments ayant au moins six chaînons de carbone, comme dans la leucine.

A côté de cette leucine, on trouve un corps qui l'accompagne presque toujours, la tyrosine, et qui est pourtant d'une composition très différente, car elle a un noyau benzinique. Deux atomes voisins du noyau sont remplacés l'un par une molécule OH, ce qui donne le phénol, la seconde par de l'acide amidopropionique débarrassé d'une molécule

d'hydrogène pour acquérir une atomicité disponible, de sorte que l'ensemble constitue l'acide paraoxyphénylamidopropionique, dont le nom est un peu long, mais traduit en échange bien la constitution. Le noyau aromatique existe donc aussi dans la molécule albuminoïde; il s'y était déjà révélé d'ailleurs, par la présence, dans les produits de la digestion, de corps odorants, tels que le phénol, qu'on y trouve en nature, l'indol, le scatol, l'acide scatolcarbonique, tous corps ayant aussi un noyau benzinique garni d'appendices latéraux plus ou moins compliqués.

Viennent ensuite des corps que M. Schutzenberger a appelés acides hydroprotéiques, et qui ont pour formule générale $C^nH^{2n}Az^2O^5$. Ceux-ci se rattachent à la série du Pyrrol, dont nous parlions tout à l'heure et nous conduisent à admettre la présence d'un groupement nouveau C^4H^4Az, où les atomes d'hydrogène peuvent être remplacés par des groupements plus complexes.

On trouve enfin des glucoprotéines $C^nH^{2n}AzO^2$, et des acides protéiques $C^nH^{2n-2}Az^2O^5$, dont l'étude n'est pas complète, mais semble ne pas devoir révéler d'autres groupements que ceux que nous connaissons déjà.

Si j'ajoute maintenant que les diverses matières albuminoïdes ne donnent pas identiquement les mêmes produits de décomposition, ou ne les donnent pas dans les mêmes proportions, on verra, en gros, que rien ne nous empêche de voir dans la molécule albuminoïde un groupement complexe, de même structure partout quant à ses éléments fondamentaux, ce qui donne à la matière albuminoïde ses propriétés générales. Ces groupements, qui constituent le squelette de la molécule, peuvent à leur tour être modifiés par l'introduction de chaînes latérales plus ou moins longues et plus ou moins dichotomisées, ce qui ouvre la porte à des variations comme celles dont nous trouvons un exemple dans la série des acides amidés que nous avons signalée plus haut, et à des isoméries au milieu d'une composition uniforme comme celles qui nous ont servi d'exemples au paragraphe précédent. Sous ce rapport les résultats du remarquable travail analytique de M. Schutzenberger sont en accord avec les conclusions de notre Revue précédente, et, en leur donnant un corps, une figure, en les traduisant pour l'esprit en une image de structure, on leur donne un degré de fermeté et de précision qui en augmente de beaucoup l'intérêt.

V

Avons-nous maintenant le droit de pousser plus loin, et d'admettre que la molécule albuminoïde contient tous ces produits divers sous la forme sous laquelle ils se révèlent à nous, abstraction faite de ces

questions d'hydratation dont nous avons parlé, et dont il est toujours facile de tenir compte. Peut-on admettre qu'au moment de la décomposition, chacun d'eux est séparé du tronc commun, à la façon des rameaux d'un arbre qu'on ébranche, et sans qu'il s'y produise aucune fracture nouvelle en vertu de ce jeu de forces moléculaires qui interviennent toujours pour donner aux groupements nouveaux leur maximum de stabilité. Il se fait dans ce but, à l'intérieur de la molécule, des *migrations atomiques*, c'est-à-dire que les atomes qui formaient des groupements instables s'associent à nouveau, sans trop tenir compte de leurs liaisons antérieures (et aussi, bien entendu, sans tenir compte des idées que nous pouvons nous former sur eux) pour former des groupes stables et nouveaux. La chimie a tablé pendant longtemps sur la rareté de ces migrations atomiques, parce qu'elle n'en trouvait pas beaucoup d'exemples dans la série grasse et dans la série aromatique qu'elle connaissait le mieux, et parce qu'on a toujours tendance à conclure du connu à l'inconnu. Mais elle aurait pu réfléchir que c'était précisément parce que les migrations atomiques étaient rares dans les corps de la série grasse et de la série aromatique que les corps de cette série étaient les plus stables, par suite aussi ceux qui se rencontraient le plus souvent, par conséquent encore les plus faciles à connaître et les mieux connus. Il était donc imprudent de conclure de ce qu'on savait à ce qu'on ne savait pas, et en fait, la possibilité de migrations atomiques, de groupements nouveaux dans les fragments divers d'une molécule qui se brise, doit toujours entrer en ligne de compte. Il faut toujours se demander si elle existe ou si elle n'existe pas.

Quand on traite un corps gras par la potasse ou la baryte, il s'hydrate et donne, en se détruisant, un acide gras et de la glycérine. Ces deux groupements existaient tout formés dans la matière initiale, et la preuve, c'est qu'en les isolant, on peut, par des actions très faibles, les recombiner à nouveau et retrouver le corps gras dont on les a tirés. Mais ce n'est pas toujours qu'il en est ainsi. Reprenons cette même glycérine, résultat de la première opération, et continuons à la chauffer en présence de la potasse. Même sans porter très haut la température, nous la verrons se décomposer et donner de l'acide acétique et de l'acide formique avec dégagement d'hydrogène. Or, on est sûr que les deux groupements acétique et formique n'existent pas tout formés dans la molécule de glycérine. Pour les former, il a fallu qu'il se produisît à l'intérieur de cette molécule un chassé-croisé d'atomes qui en modifie complètement les groupements originels ; il a fallu une *migration atomique*.

Dans ce cas, cette migration s'est accomplie sous l'influence de forces très faibles, moins puissantes que celles que nous mettons en

jeu dans le dédoublement des matières albuminoïdes, mais conduisant comme elles à un dégagement d'hydrogène et à la formation de groupements plus simples. C'est que l'albumine résiste plus que la glycérine aux actions purement chimiques; mais il y a d'autres actions vis-à-vis desquelles la différence est moins grande et la comparaison plus légitime.

Parmi ces forces, celle qui se présente la première à l'esprit, quand il s'agit de chimie vivante, c'est celle des ferments. Voici du sucre : on n'en connaît pas encore bien exactement la constitution atomique; mais peu importe, elle est une, et ne saurait être très compliquée, étant donné le petit nombre d'atomes qui y entrent. Or voilà que sous l'action des ferments, ce sucre peut donner naissance, par des dédoublements précédés d'hydratation, sans pertes sensibles de substance, à de l'alcool et à de l'acide carbonique dans la fermentation alcoolique, à deux molécules d'acide lactique dans la fermentation lactique, à toute la série des acides gras dans les fermentations butyriques diverses, à de la mannite, à de la cellulose, etc. Beaucoup de ces groupements divers peuvent être reproduits par de simples actions chimiques. Au soleil et en présence des alcalis, le sucre donne, par exemple, comme je l'ai montré, de l'alcool, de l'acide carbonique, de l'acide formique, de l'acide oxalique. Dira-t-on que tous ces groupements existaient à la fois dans la molécule de sucre? C'est évidemment impossible, et dès lors nous voilà condamnés à conclure que rien ne démontre non plus que les corps si nombreux que M. Schutzenberger a rencontrés dans ses études préexistent davantage dans la molécule de matière albuminoïde.

Il y aurait un moyen de le démontrer, celui que nous avons cité plus haut à propos des corps gras. Il faudrait pouvoir reconstituer la molécule albuminoïde, ou au moins un corps analogue, en partant de ces leucines et leucéines qu'on a obtenues par l'action des alcalis. M. Schutzenberger a en effet obtenu, en déshydratant par l'acide phosphorique à 125° un mélange d'urée séche, de leucines et de leucéines, une substance présentant les plus grandes analogies avec les peptones, et par conséquent avec les matières albuminoïdes. M. Grimaux est arrivé de son côté à des résultats du même ordre, en faisant agir l'un sur l'autre certains produits de la décomposition chimique ou physiologique de la matière albuminoïde, l'urée, l'anhydride aspartique et amidobenzoïque. Les colloïdes qu'il obtient présentent des analogies nombreuses avec les matières albuminoïdes.

Mais de quoi résultent ces analogies? de réactions communes. Nous voilà donc amenés à nous demander ce que signifient ces réactions. Appartiennent-elles à la matière albuminoïde *in integro?* Sont-elles au contraire dues à des matériaux nouveaux formés pendant la réac-

tion, et par la réaction elle-même. On comprend l'intérêt de la réponse à cette question. Si c'est la matière albuminoïde reconstituée qui fournit les réactions sur lesquelles on a tablé pour affirmer cette reconstitution, le problème est résolu. Si ce sont au contraire les produits de dislocation, qui isolés ou mélangés, donnent ces réactions prétendues des matières albuminoïdes, ou bien s'il entre dans ces réactions des phénomènes dépendant de l'état colloïdal, qui appartient à d'autres matières que les albumines, le problème reste ouvert, et la constitution des matériaux azotés des tissus vivants, bien qu'éclairée d'une vive lumière par les travaux de M. Schutzenberger, n'est pas encore tout à fait élucidée.

IV

Reprenons donc, sinon toutes ces réactions des matières albuminoïdes, au moins les principales, et classons-les par ordre de sensibilité. Nous rencontrons d'abord la *réaction de Millon :* quand on fait bouillir un liquide faiblement albumineux avec du nitrate de mercure contenant des traces d'acide nitreux, on obtient un précipité rouge avec coloration rouge du liquide. Cette réaction si souvent utilisée est due à ce qu'il se forme pendant l'opération un corps de la série aromatique, sans aucun doute cette tyrosine dont nous avons parlé plus haut. La tyrosine présente au plus haut degré cette réaction qui, pour elle, est connue sous le nom de *réaction de Hoffmann,* et on retrouve une coloration ou des précipités analogues avec tous les dérivés de la benzine contenant un groupe hydroxyle OH soudé au noyau hexagonal, tel que le phénol, le crésol, etc.

Vient ensuite la *réaction xanthoprotéique.* Bouillies avec l'acide azotique concentré, les matières albuminoïdes donnent un précipité, ou au moins une coloration jaune, qui passe à l'orangé quand on sursature avec l'ammoniaque. Cette réaction provient, comme la précédente, de la mise en liberté pendant l'action des groupes benzéniques. Elle peut provenir aussi en partie du groupe qui contient l'indol, le scatol, et l'acide scatolcarbonique.

La *réaction d'Adamkiewicz* consiste dans l'emploi d'un mélange de 1 volume d'acide sulfurique concentré et de 2 volumes d'acide acétique cristallisable. Au contact des matières albuminoïdes, il se développe une coloration violette qui se manifeste à la température ordinaire, et plus rapidement si on chauffe. Le phénomène est encore plus marqué en présence de traces d'un nitrite. La gélatine ne donne pas ou donne mal cette réaction, qui, à l'inverse des précédentes, ne réussit bien qu'avec le groupe de l'indol, et est très nette surtout avec l'acide scatolcarbonique.

La *réaction de Piotrowski* ou *du biuret*, si souvent mise en avant, s'obtient en ajoutant à une solution d'albumine, d'abord de la lessive de soude ou de potasse, puis goutte à goutte une solution de sulfate de cuivre, jusqu'à apparition d'une couleur violacée qui devient ensuite violette. Cette réaction semble appartenir, non pas, comme les précédentes, à des groupements faisant partie de la série aromatique, mais à des groupements azotés de la série grasse. M. Grimaux a en effet montré qu'on la retrouvait avec l'acide aspartique et M. Lœw avec les dérivés éthérés du glycocolle.

Nous retrouverons cette réaction du biuret à propos des peptones. Si elle figure ici à sa place au milieu des réactions colorées, elle diffère de ses voisines en ce qu'elle est immédiate, tandis que les autres, exigeant la formation préalable du corps qui les fournit, mettent toujours un certain temps à se manifester. En outre ces réactions sont des réactions violentes, tandis que celle-ci ne met en action que des actions chimiques de médiocre puissance.

Enfin, et pour terminer avec la série de réactions qui mettent en jeu des réactifs violents ou des actions énergiques, nous avons la *réaction de Liebermann*, qui consiste à traiter par l'acide chlorhydrique concentré et bouillant la matière albuminoïde, aussi bien dégraissée que possible par un lavage préalable à l'alcool et à l'éther. On obtient une magnifique coloration violet bleu. Ici les groupements aromatiques ne semblent jouer aucun rôle, et ce sont des corps de la série grasse qui sont actifs.

On voit que presque toutes ces réactions sont des réactions de décomposition; elles ne peuvent servir à prouver qu'une chose, c'est qu'il entre dans la matière albuminoïde des groupements variés, appartenant à la série grasse et à la série aromatique, mais sans nous assurer que ces groupements y entrent sans se disloquer, et que la réaction qui les met en évidence n'est pas aussi celle qui les produit.

Pour pousser plus loin, il faudrait aborder l'étude des *réactions* dites *de précipitation*, reposant sur l'emploi du tannin, des acides phospho-tungstique et phospho-molybdique, des sels alcalins ou alcalino-terreux. Mais ici la question se complique beaucoup. L'emploi de ces réactifs a servi à établir une foule de distinctions, à créer une foule d'espèces, à donner naissance à une foule de noms. Plus on va, plus la dichotomisation fait des progrès, et la simple nomenclature des diverses matières albuminoïdes déjà baptisées prend les allures d'un petit dictionnaire. Dans quelle proportion doivent se mêler, sur ce sujet, les doses de foi et de scepticisme qui sont dans l'esprit de tout vrai savant? C'est là une question qu'il est impossible d'aborder à la fin de cette Revue, et qui mérite de faire à elle seule le sujet d'une Revue nouvelle. Contentons-nous pour le moment de tirer la conclusion de

celle-ci : c'est que malgré tous nos efforts, le secret de la structure de la molécule albuminoïde nous est resté caché. Nous ne pouvons pas la définir par sa formule; nous ne pouvons pas la définir par ses propriétés. En somme, nous ne savons pas ce que c'est qu'une matière albuminoïde. Savons-nous mieux ce que sont les diverses matières albuminoïdes, et à défaut de caractères communs, ont-elles au moins des caractères différentiels assez accusés pour qu'on puisse ne pas les confondre ? C'est ce que nous discuterons dans une Revue prochaine.

DUCLAUX.

G. STERNBERG. Rapport sur l'étiologie et la prévention de la fièvre jaune. *Washington*, 1890.

Nous avons déjà fait, dans ces *Annales* (v. t. IV, p. 253), un court résumé du rapport de M. Sternberg sur la prophylaxie de la fièvre jaune. Ce travail était surtout un travail d'enquête au sujet des résultats obtenus par les savants qui disaient avoir découvert un vaccin efficace contre cette maladie. M. Sternberg a fait depuis des recherches personnelles, qu'il expose dans une publication nouvelle, et qui sont surtout des recherches sur le cadavre, des cultures des microbes rencontrés dans le foie, les tissus, le canal intestinal, enfin des inoculations des microbes suspects à des animaux d'expérience. Ces recherches sont trop nombreuses et trop variées pour être résumées ici. Elles n'ont d'ailleurs eu aucun résultat positif au point de vue de l'étiologie, mais elles ont le mérite d'avoir éclairé le chemin et montré les difficultés de la question. Voici en abrégé les conclusions qu'on peut tirer du mémoire de M. Sternberg.

Aucune des méthodes bactériologiques employées n'a permis de découvrir nulle part dans les cadavres un microbe pouvant être considéré comme l'agent spécifique infectieux de la fièvre jaune. Dans les tissus et dans le sang les microbes sont rares, et celui qu'on y trouve le plus souvent est le *Bacterium coli commune*, qui est un microbe banal. Le foie contient de rares bacilles au moment de la mort. Ces bacilles s'y développent et tout est envahi après 24 ou 48 heures. Il y en a plusieurs espèces, parmi lesquelles le *Bact. coli commune*. A ce moment une injection sous-cutanée d'une émulsion de ce foie devient pathogénique pour les cochons d'Inde, mais les désordres produits n'ont rien de commun avec ceux de la fièvre jaune.

L'intestin n'a fourni non plus aucun germe d'apparence spécifique. Le *Bacterium coli commune* y est le microbe le plus abondant. Un

autre bacille, appelé par M. Sternberg *bacillus x*, très pathogène pour le lapin en injections péritonéales, joue peut-être un rôle dans l'étiologie de la fièvre jaune, mais il n'y a sur ce point que des probabilités et pas de certitude. C'est le seul qu'on n'ait pas rencontré ailleurs que dans les cadavres des morts de fièvre jaune. Tous les autres microbes décrits semblent être des microbes banaux.

Cependant c'est du côté de l'intestin que la recherche semble devoir être la plus féconde, car tous les faits recueillis au sujet de l'origine et de l'extension de la fièvre jaune conduisent à penser que l'agent spécifique infectieux est contenu dans les déjections des malades, et que ce sont les accumulations de matière fécale et de matière organique qui favorisent le développement de ces germes lorsque de certaines conditions de climat sont satisfaites.

Comme le développement se fait plus facilement dans la nature que dans nos matras d'expérience, on a le droit de penser que la multiplication du germe spécifique dépend peut-être de phénomènes de symbiose. On trouve en effet, dans les préparations de matière fécale, des espèces qui refusent absolument de se reproduire dans les milieux nutritifs ordinaires.

D'autres faits étiologiques conduisent en outre à penser que le microbe de la fièvre jaune est un anaérobie.

Il n'y a aucune preuve que la fièvre jaune puisse être propagée par les eaux de boisson, comme cela a lieu pour la fièvre typhoïde et le choléra. Son extension est beaucoup plus brusque et son aire d'expansion plus limitée que pour ces deux maladies ; elle éclate de 10 à 15 jours après l'arrivée d'un navire infecté ou d'un malade, débute toujours par le voisinage du malade ou du vaisseau, s'étend ensuite, et en outre se limite d'une façon bien précise. Dans des villes pourvues d'une canalisation d'eaux communes, une partie reste indemne pendant que l'autre est décimée.

Il faut donc faire grande attention aux déjections des malades, les désinfecter soigneusement, et ces précautions, jointes à des mesures de quarantaine et de police sanitaire, peuvent suffire à prévenir l'implantation de la fièvre jaune et à en arrêter l'extension.

Dx.

C. Brunner. Sur l'élimination des microorganismes pathogènes par la sueur. *Berl. Klin. Wochenschr.*, 25 mai 1891, p. 505.

L'intéressant travail de M. Brunner nous donne l'occasion de revenir sur l'état de nos connaissances relatives à l'élimination des microbes pathogènes par les divers émonctoires de l'organisme. Cette

question a été, comme on sait, posée par M. Wyssokowitch [1], dans son mémoire sur le sort des microbes injectés dans le sang des animaux vivants. Il ne les a vus s'éliminer ni par les reins ni par le canal intestinal, tant que les tissus de ces organes restaient sains. L'urine n'en contient qu'à la suite de lésions locales de l'appareil uropoiétique, et le contenu intestinal qu'à la suite d'extravasations sanguines ou d'altérations des tissus.

Tout à fait à l'antipode de ces résultats sont ceux de Trambusti et Maffucci [2], qui ont vu les bacilles du charbon chez les cochons d'Inde, et ceux de la fièvre typhoïde chez les lapins se retrouver d'une façon constante dans l'urine, la bile ou les matières fécales, sans que l'inspection microscopique la plus minutieuse pût relever de changements histologiques dans les reins, le foie ou la paroi intestinale.

Boccardi [3] se range du côté de Wyssokowitch, et professe l'impénétrabilité des glomérules et des vaisseaux capillaires du rein pour la bactéridie, tant qu'ils restent sains. Baumgarten [4] trouve cette opinion exagérée, parce qu'il a vu les bacilles de la tuberculose passer du sang dans les tissus sans aucune altération des parois vasculaires.

Cette mention du bacille de la tuberculose nous amène à l'étude du lait. Nous avons déjà parlé, dans ces *Annales*, des résultats de Bollinger, Hirschberger, Ernst, May, Nocard, etc. De leur ensemble, on peut conclure que le danger du passage du bacille tuberculeux dans le lait est grand quand la mamelle est tuberculeuse, mais existe encore lorsqu'elle est saine, si l'animal est tuberculeux. Les recherches d'Escherich [5], confirmées par celles de Longard [6] et de Karlinski [7], témoignent, du reste, de la possibilité du passage dans le lait de divers microbes pathogènes contenus dans le sang, alors que la mamelle est saine. Passet a vu de même les staphylocoques passer dans les sécrétions de la conjonctive, et il semble, en somme, que le passage possible de certains microbes au travers de certains tissus sains ne soit pas contestable. Les conditions de ce passage sont d'ailleurs en relation trop étroite avec l'action des globules blancs pour que nous ayons à y insister dans ces *Annales*.

Mais de ce que, en principe, les microbes *peuvent* passer partout, il ne faut pas en conclure qu'ils y passent. Il y a une étude spéciale à

1. *Archiv. f. Hygiene*, 1886.
2. *Rivista internaz. di med. e chirurgia*, 1886.
3. *Riforma medica*, 1888.
4. *Lehrbuch d. pathol. Mykologie.*
5. *Fortschritte d. Medicin*, t. III.
6. *Arbeiten aus d. pathol. Institut zu München*, 1886.
7. *Prager med. Woch*, 1890.

faire pour chaque microbe et chaque tissu ; encore n'est-il pas sûr qu'il ne faille pas pousser plus loin, et faire intervenir les propriétés biologiques actuelles du microbe et du tissu intéressés dans l'expérience. Il est probable qu'un microbe atténué ne se comporte pas à ce sujet comme un microbe virulent, ni un tissu malade et affaibli comme un tissu sain et bien vivant.

A cela viennent se joindre parfois d'autres difficultés expérimentales dont nous allons prendre une idée en arrivant au travail de Brunner. Ce savant s'est proposé de rechercher si certaines espèces pathogènes pouvaient passer dans la sueur. La méthode qui se présente tout naturellement à l'esprit est de désinfecter avec soin, au moyen de lavages antiseptiques, une région riche en glandes sudoripares, sur un animal qui a reçu dans le sang l'espèce de microbes à étudier, de provoquer ensuite naturellement ou artificiellement une sudation abondante et, quand on voit perler en un point une goutte de sueur, à aller la puiser avec un fil ou une anse de platine pour en faire, à la façon ordinaire, l'étude bactériologique.

On voit de suite que ces lavages antiseptiques préliminaires sont de la plus haute importance. A la surface et dans les replis de la peau d'un phtisique, on peut trouver des bacilles de la tuberculose, comme l'a fait M. *di Mattei* [1], et n'en plus rencontrer quand on a soumis la peau à une désinfection soigneuse. De même dans le cas grave de furoncle qu'a étudié M. Brunner, le malade, dans le sang duquel circulaient des microbes pyogènes, pouvait en présenter à la surface du corps, à la suite de son furoncle et du traitement par incision, sans qu'on pût accuser ces microbes d'avoir été transportés par la sueur.

Il y a plus. Quand il s'agit des glandes sudoripares, on n'est jamais sûr que le nettoyage le plus soigneux les ait désinfectées à fond, et que les microbes qu'on trouve dans la sueur qui les a traversées après lavage provienne du sang, et non d'une culture locale ou d'une pénétration antérieure de microbes venus de l'extérieur dans la profondeur de la glande. M. Brunner a retrouvé 6 fois sur 8, sur son malade, le *Staphylococcus albus* dans des gouttes de sueur, au moment où ce même microbe se montrait aussi dans le sang. Mais il se garde de tirer une conclusion ferme de cette expérience et de quelques autres qu'il a instituées, et il recourt avec raison à une expérience plus topique.

La meilleure manière d'éviter les difficultés d'interprétation que nous soulevions tout à l'heure est évidemment d'injecter à un animal le microbe d'une maladie tout à fait exceptionnelle chez lui, de façon à ce qu'il n'y ait pas à redouter la présence accidentelle, dans les glandes de la sueur, du microbe de cette maladie. L'animal est alors

1. *Archivio per le scienze mediche*, 1888.

soumis à une sudation abondante par un moyen approprié, et on cherche à retrouver dans sa sueur le microbe inoculé.

M. Brunner a fait dans cet ordre d'idées 3 expériences dont la valeur probante est inégale, mais qui gagnent à être groupées. La première a porté sur un cochon de lait auquel on avait inoculé dans les veines du *staphylococcus aureus*, qui l'avait rendu très malade. L'injection de 5 milligrammes de pilocarpine a permis de provoquer au voisinage du groin de l'animal, préalablement débarrassé de ses poils et bien lavé, une sudation abondante dans les produits de laquelle on a pu constater, 2 fois sur 3 essais, le *staphylococcus aureus*. Mais ce microbe est encore trop répandu et trop commun pour que cette expérience soit irréfutable.

Une seconde expérience a été faite sur un jeune chat auquel on a inoculé dans l'artère crurale du bacille charbonneux contenant des spores. Deux heures après, on force la patte de l'animal, on nettoie et on lave avec soin les masses charnues de la base des orteils, et on faradise le nerf sciatique. Il se produit sur les parties nettoyées, des gouttelettes limpides de sueur qui, ensemencées, donnent une culture de bactéridies.

Enfin, à la suite de l'injection d'un microbe non pathogène, le *micrococcus prodigiosus*, dans les veines d'un cochon de lait, et une demi-heure après l'injection de $0^{gr},01$ de pilocarpine, on a retrouvé le microbe non seulement dans la sueur au pourtour du groin, mais aussi dans la salive.

M. Brunner est donc autorisé à conclure que les microbes pathogènes et non pathogènes peuvent s'éliminer par la sueur et même par la salive. Le fait est non seulement important au point de vue théorique, il l'est aussi pour la thérapeutique, l'hygiène et même l'étiologie de certaines maladies. Il est clair, par exemple, qu'en ce qui concerne les furoncles, les idées qu'on se fait sur la transmission purement extérieure de la maladie sont bien caduques, si l'invasion des glandes sudoripares peut se faire par le sang et sans lésion histologique des tissus. Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes traitées prise de rage pendant le traitement.

Bommelle (Xavier), 54 ans, demeurant à Remy (Oise). — Mordu le 17 octobre 1891 au nez et à la lèvre inférieure. Il présente deux morsures, ayant un peu saigné, près de la racine du nez, et une autre, ayant saigné également, sur la muqueuse de la lèvre inférieure, partie droite.

Ces blessures ont été cautérisées à l'alcali, une demi-heure après l'accident. Le chien mordeur a été reconnu enragé, à l'autopsie, par M. Vervel, vétérinaire, à Estrées-Saint-Denis.

Bommelle subit les inoculations à l'Institut Pasteur, du 20 octobre au 9 novembre. Il était alcoolique.

Dès le 6 novembre, le sommeil et l'appétit ont complètement disparu, sans que les médecins de l'Institut Pasteur en soient prévenus. Il retourne à Remy, le 9 novembre. Ce jour même, il se plaint d'insomnies, avec cauchemars, d'inappétence, de répulsion pour les liquides.

Le lendemain, les symptômes s'accentuent ; le docteur Manière, appelé, diagnostique la rage, et le malade succombe, le 12 novembre, à 6 heures du matin.

(Renseignements donnés par M. le docteur Manière, à Estrées-Saint-Denis.)

Bolinhas (José), 4 ans, demeurant à Crato (Portugal). — Mordu le 3 novembre 1891, par un chien reconnu enragé, ainsi que le constate un certificat donné par M. le délégué de la santé publique du district de Lisbonne. Bolinhas, présente sur la partie moyenne de la joue gauche, trois morsures peu étendues, mais assez pénétrantes, ayant saigné. Les plaies n'ont pas été cautérisées.

L'enfant Bolinhas se présente aux inoculations, le 13 novembre (10 jours après l'accident).

Le 4 décembre, les premiers symptômes de la rage se manifestent (hydrophobie, aérophobie). On le conduit à l'hôpital des Enfants, où il succombe à la rage convulsive, le 7 décembre, à six heures du matin.

Deux autres enfants, mordus grièvement par le même chien, et ayant subi le traitement complet, sont actuellement en bonne santé.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE [1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE — NOVEMBRE 1891.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	3	4	»	3	9	»	2	5
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	1		»	6		»	3	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	2	»	»	4	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	5	»	»	4	»	»
Morsures aux mains { simples	»	5	8	»	17	47	»	4	14
Morsures aux mains { multiples	»	3		»	30		»	10	
Cautérisations efficaces	»	»	»	6	»	»	2	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	23	»	»	5	»	»
Pas de cautérisation	5	»	»	18	»	»	7	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	6	9	»	4	11	»	4	13
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	3		»	7		»	9	
Cautérisations efficaces	2	»	»	1	»	»	1	»	»
— *inefficaces*	3	»	»	8	»	»	9	»	»
Pas de cautérisation	4	»	»	2	»	»	3	»	»
Habits déchirés	8	»	»	10	»	»	9	»	»
Morsures à nu	1	»	»	1	»	»	4	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	5	5		3	3
Cautérisations efficaces	1	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	2	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Habits déchirés	1	»	»	1	»	»	3	»	»
Morsures à nu	1	»	»	5	»	»	3	»	»
Totaux. { **Français et Algériens**		19	22		65	72		24	35
Totaux. { **Etrangers**		3			7			11	
	A			B			C		
TOTAL GÉNÉRAL				129					

1. La colonne A comprend les personnes mordues par des animaux dont la rage est reconnue expérimentalement; la colonne B celles mordues par des animaux reconnus enragés à l'examen vétérinaire; la colonne C les personnes mordues par des animaux suspects de rage.

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 121 fois; chats, 7 fois ; mulet, 1 fois.

TABLE DES MATIÈRES

Contribution à l'étude du tétanos, par MM. Vaillard et Vincent 1
Recherches sur les fonctions de la rate dans les maladies infectieuses, par M. Bardach 40

Sur la stérilisation du lait, *Revue critique*. 50
Sur une race de bacilles du lait bleu ne donnant plus de matière colorante, par M. Behr. 60
Sur le poison du choléra, par M. Scholl. 60
Statistique de l'Institut Pasteur, décembre 1890. 63

Les races du bacille pyocyanique, par M. Gessard 65
Contribution à l'étude des eaux d'Alger, par M. Péré. . . 79
Recherches sur les organismes de la nitrification (4e mémoire), par M. Winogradsky 92
Sur une action directrice qu'exercent certains corps sur les tubes sporangifères de *Phycomyces nitens*, par M. Elfving 101
Recherches sur les nodosités radicales des légumineuses, par M. E. Laurent 105

Vaccination contre la diphtérie, par C. Fraenkel 140
Statistique de l'Institut antirabique de Naples 142
Statistique de l'Institut Pasteur, janvier 1891. 142

Contribution à l'étude de la vaccination charbonneuse, par Mme O. Metchnikoff. 145
Sur un régulateur de température applicable aux étuves, par M. Roux 158
Recherches sur la digestion intracellulaire chez les protozoaires, par M. F. Le Dantec. 163
Action de l'acide sulfureux sur quelques champignons inférieurs, et en particulier sur les levures alcooliques,

39140

par M. G. Linossier 171
Les maladies du bétail en Australie, par MM. Bruce et Loir 177

La Tuberculine, *Revue critique* 184
Statistique de l'Institut Pasteur, février 1891 207

Étude expérimentale des ostéomyélites à staphylocoques et à streptocoques, par MM. Lannelongue et Achard . . 209
De l'influence de quelques variations du terrain organique sur l'action des microbes pyogènes, par M. Herman . . 243

Le filtrage des eaux de fleuves, *Revue critique* 257
Sur l'état des acides pendant la digestion gastrique chez les nourrissons, par M. Heubner 267
Statistique de l'Institut Pasteur, mars 1891 272

Sur un bacille trouvé dans un cas de septicémie hémorragique présentant certains caractères du typhus exanthématique, par MM. Babes et Oprescu 273
Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau, par M. L. Perdrix 287
Dysenterie épizootique des poules et des dindes, par M. Lucet 312
Sur la question de la structure des bactéries, par M. Protopopoff 332
Traitement du charbon par le bicarbonate de soude, par M. Chor 337
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur, par M. Perdrix 344

Les acides lactiques isomères, comme moyen de reconnaître certaines espèces microbiennes, par M. Nencki 349
Statistique de l'Institut Pasteur, avril 1891 351

Sur une maladie parasitaire de l'homme transmissible au lapin, par MM. Du Cazal et Vaillard 353
Sur le sort des microbes dans l'organisme animal, par M. le Dr Trapeznikoff 362
Contribution à l'étude physiologique des levures alcooliques du lactose, par M. Kayser 395

Sur la digestion dans l'intestin grêle, *Revue critique* 406

Sur la présence du méthylmercaptan dans l'urine humaine, après une consommation d'asperges, par M. Nencki 413
Méthode de recherche du bacille typhique dans les eaux potables, par M. Parietti 413
Statistique de l'Institut Pasteur, mai 1891. 415

Le chimiotaxisme des leucocytes et l'infection microbienne, par MM. Massart et Bordet. 417
Recherches sur le parasite des fièvres paludéennes irrégulières, par M. Sakharoff 445
Étude sur la pneumonie fibrineuse, par M. Tchistowitch. 450
Note sur les ferments de l'ananas, par M. Kayser. 456
Statistique de l'Institut Pasteur, juin 1891. 464
Études sur l'immunité (4e mémoire), par M. Metchnikoff. 465
Sur la propriété bactéricide du sang de rat, par MM. Metchnikoff et Roux 479
Étude sur les substances microbicides du sérum et des organes d'animaux à sang chaud, par M. de Christmas. 487
Sur la substance bactéricide du sang, décrite par le professeur Ogata, par M. Petermann 506
Influence du sang de grenouille sur la résistance des souris contre le charbon, par M. Roudenko 515
De l'immunité acquise et de l'immunité naturelle, par M. Roux 517

La théorie des phagocytes au congrès de Londres, *Revue critique*. 534
Le choléra et l'alimentation d'eaux dans la ville de Péterhof, par M. Dobroslavine 542
Statistique de l'Institut Pasteur, juillet 1891 543

Recherches sur la fièvre récurrente, par M. Soudakewitch. 545
Spirochæta anserina, et la septicémie des oies, par M. Sakharoff 564
Recherches sur l'accoutumance aux produits microbiens, par MM. Metchnikoff et Roudenko. 567
Études sur les organismes de la nitrification (5e mémoire), par M. Winogradsky 577

Sur quelques antiseptiques de la série aromatique, *Revue critique* 617
Statistique de l'Institut Pasteur, août 1891 623

Expérience sur l'atténuation du virus fixe rabique, par

MM. Babes et Cerchez 625
Notes sur la rage en Indo-Chine, par M. Calmette 633
Statistique de l'Institut antirabique de Turin, par M. Borboni-Uffreduzzi 642
Statistique de l'Institut antirabique de Palerme, par MM. de Blasi et Russo-Travali 646
Statistique de l'Institut de Charkow, par M. Wysokowicz . . 649
Observations bactériologiques sur les furoncles du conduit auditif externe, par MM. Maggiora et Gradenigo. . . . 651
Étude de la morue rouge, par M. Le Dantec 656
Le cantharidate de potasse dans le traitement de la tuberculose, par M. de Christmas. 668

Les bacilles de la fièvre typhoïde, par M. Monti. 671
Statistique de l'Institut Pasteur, septembre 1891 672

Recherches sur la destruction des microbes par les cellules amiboïdes dans l'inflammation, par M. Ruffer 673
Sur les causes de l'atténuation des moelles rabiques, par M. E. Viala 695
Contribution à l'étude de la culture des bactéries sur les milieux colorés, par M. Legrain 707
Statistique du traitement antirabique à Varsovie, par M. Bujwid. 710

Les matières albuminoïdes, *Revue critique*. 712
La Tuberculine, *Revue critique*. 722
Contribution au traitement des cobayes tuberculeux par la tuberculine de Koch, par M. Pfuhl. 729
Statistique de l'Institut Pasteur, octobre 1891 735

Fonctions et races du bacille cyanogène, par M. Gessard . 737
Contribution à l'étude de la microbiose malarique, par M. B. Danilewsky. 758

Sur la constitution des matières albuminoïdes, *Revue critique* . . 783
Sur l'étiologie et la prévention de la fièvre jaune, par M. Sternberg 796
Sur l'élimination des microbes par la sueur, par M. Brunner. . . 797
Statistique de l'Institut Pasteur, novembre 1891 801
Table des matières 803
Tables générates des tomes I à V. 811

FIN DE LA TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

ACHARD. . . . . V. LANNELONGUE.

BABES et OPRESCU . . . Sur un bacille trouvé dans un cas de septicémie hémorragique. 273
BABES et CERCHEZ . . . Atténuation du virus rabique 625
BARDACH . . . . . Fonctions de la rate dans les maladies infectieuses 40
BORDET . . . . . V. MASSART.
BORDONI-UFFREDUZZI . . Statistique de Turin. 642
BRUCE et LOIR. . . . . Les maladies du bétail en Australie. 177
BUJWID . . . . . Statistique du traitement antirabique à Varsovie 710

CALMETTE. . . . . Sur la rage en Indo-Chine 633
CHOR. . . . . Traitement du charbon par le bicarbonate de soude. 337

DANILEWSKY. . . . . Microbiose malarique. 758
DE BLASI et RUSSO-TRAVALI. Statistique de Palerme 646
DE CHRISTMAS . . . . . Substances microbicides du sérum et des organes. 487
— Le cantharidate de potasse dans le traitement de la tuberculose 668
DU CAZAL et VAILLARD. Sur une maladie parasitaire de l'homme transmissible au lapin. 353

ELFVING. . . . . Action directrice sur les tubes sporangifères du *phycomyces nitens*. 101

GESSARD. . . . . Les races du bacille pyocyanique. 65
— Les bacilles du lait bleu 737
GRADENIGO . . . . . V. MAGGIORA.

HERMAN. . . . . Influence des variations du terrain organique sur les microbes pyogènes. 243

KAYSER. . . . . Levures alcooliques de lactose 395
— Sur les ferments de l'ananas. 456

LANNELONGUE et ACHARD. Étude des ostéomyélites. 209
LAURENT . . . . . Nodosités radicales des légumineuses. 105

Le Dantec (Dr)	Étude de la morue rouge	656
Le Dantec (F.)	Digestion intracellulaire chez les protozoaires.	163
Legrain	Culture des bactéries sur les milieux colorés .	797
Lucet.	Dysenterie épizootique des poules et des dindes.	312
Linossier.	Action de SO^2 sur les champignons et les levures	171
Maggiora et Gradenigo.	Furoncles du conduit auditif externe.	651
Massart et Bordet . .	Chimiotaxisme des leucocytes et infection . .	417
Metchnikoff (Mme). . .	Vaccination charbonneuse.	145
Metchnikoff (E.). . . .	Recherches sur l'immunité (4e mémoire) . . .	465
— et Roudenko.	Accoutumance aux produits microbiens. . . .	567
— et Roux . . .	Propriété bactéricide du sang de rat	479
Perdrix	Fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau	287
—	Vaccinations antirabiques en 1890	344
Péré	Étude des eaux d'Alger	79
Petermann.	Substance bactéricide du sang.	506
Protopopoff.	Structure des bactéries	332
Roudenko.	Influence du sang de grenouille sur la résistance des souris au charbon	515
Roux.	De l'immunité acquise et de l'immunité naturelle	517
—	Sur un régulateur de température.	158
—	V. Metchnikoff.	
Ruffer.	Destruction des microbes par les cellules amiboïdes	673
Sakharoff	Parasite des fièvres paludéennes	445
—	La septicémie des oies.	564
Soudakewitch	Recherches sur la fièvre récurrente.	545
Tchistowitch.	Étude sur la pneumonie fibrineuse.	450
Trapeznikoff.	Sur le sort des spores de microbes dans l'organisme	362
Vaillard et Vincent. .	Contribution à l'étude du tétanos.	1
—	V. Du Cazal.	
Viala.	Causes de l'atténuation des moelles rabiques .	695
Winogradsky.	Recherches sur les organismes de la nitrification (4e mémoire)	92
—	Recherches sur les organismes de la nitrification (5e mémoire)	577
Wysokowicz	Statistique antirabique de Charkow.	649

REVUES ET ANALYSES.

Behr	Sur une race de bacilles du lait bleu	60
Brunner	Élimination des microbes par la sueur	797
Dobroslavine	Le choléra et les eaux à Péterhof	542
Fraenkel (C.)	Vaccination contre la diphtérie	140
Heubner	État des acides pendant la digestion gastrique	267
Monti	Les bacilles de la fièvre typhoïde	671
Nencki	Les acides lactiques isomères	349
—	Le méthylmercaptan dans l'urine	413
Parietti	Méthode de recherche du bacille typhique	413
Pfuhl	Traitement des cobayes tuberculeux par la tuberculine	729
Scholl	Sur le poison du choléra	60
Sternberg	Étiologie et prévention de la fièvre jaune	796

REVUES CRITIQUES.

Sur la stérilisation du lait 50
La Tuberculine 184
Le filtrage des eaux de fleuve 257
La digestion dans l'intestin grêle 406
L'immunité naturelle et l'immunité acquise 517
La théorie des phagocytes au congrès de Londres 534
Sur quelques antiseptiques de la série aromatique 617
Les matières albuminoïdes 712
La Tuberculine 722
Sur la constitution des matières albuminoïdes 783

STATISTIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR.

Décembre	1890	63	Juin	1891	464
Janvier	1891	142	Juillet	—	543
Février	—	207	Août	—	623
Mars	—	272	Septembre	—	672
Avril	—	351	Octobre	—	734
Mai	—	415	Novembre	—	801

PLANCHES HORS TEXTE.

Planches I et II	Mémoire de	M. Laurent.	105
Planches III, IV, V et VI. .	—	MM. Lannelongue et Achard.	209
Planche VII.	—	MM. Babes et Oprescu . . .	273
Planche VIII	—	M. Lucet	312
—	—	M. Protopopoff	332
Planche IX	—	MM. Du Cazal et Vaillard.	353
Planche X et XI	—	M. Trapeznikoff	362
Planche XII.	—	M. Sakharoff.	445
Planche XIII	—	M. Metchnikoff	465
Planches XIV, XV, XVI, XVII.	—	M. Soudakewitch	545
Planche XVII	—	M. Sakharoff	564
Planche XVIII.	—	M. Winogradsky	577
Planche XIX.	—	M. Danilewsky	758

TABLES GÉNÉRALES DES TOMES I A V

TABLE ALPHABÉTIQUE DES NOMS D'AUTEURS

I — MÉMOIRES ORIGINAUX.

A

ACHARD. . . . . Voir LANNELONGUE. . . . . .
ADAMI. . . . . Épidémie de rage sur un troupeau de daims. . . . . III. 658
ARLOING . . . . . Lettre sur l'action solaire. . . . . I. 594

B

BABES . . . . . Incubation de la rage. . . . . II. 274
BABES et LEPP . . Vaccination anti-rabique. . . . . III. 384
— et OPRESCU . Sur un bacille trouvé dans un cas de septicémie
— hémorragique. . . . . V. 273
— et CERCHEZ. . Atténuation du virus rabique. . . . . V. 625
BARDACH . . . . . Sur la vaccination intensive des chiens. . . . . I. 84
— Nouvelles recherches sur la rage. . . . . II. 9
— Rôle de la rate dans les maladies infectieuses
(1er mém). . . . . III. 577
— Même sujet. (2e mém.) . . . . . V. 40
BLAGOWETCHENSKY. . Antagonisme de la bactéridie et du bacille pyocya-
— nique. . . . . IV. 689
BLASI (DE) et RUSSO-TRAVALI. Statistique de Palerme. . . . . V. 646
BORDET. . . . . Voir MASSART.
BORDONI-UFFREDUZZI Statistique de Turin. . . . . V. 642
BOURQUELOT . . . . . Action de la chaleur sur l'amylase . . . . . I. 337
BOUTROUX. . . . . Oxydation du glucose par les microbes. . . . . II. 309
BRUCE et LOIR. . . . Les maladies du bétail en Australie. . . . . V. 177
BUJWID . . . . . Statistique du traitement à Varsovie. . . . . I. 241
— Bactéries dans la grêle . . . . . I. 592
— Réaction chimique des bacilles du choléra. . . . . II. 30
— La méthode Pasteur à Varsovie. . . . . III. 177
— Statistique de Varsovie. . . . . V. 710

C

CADÉAC et MEUNIER. Action antiseptique des essences. . . . . III. 317
CALMETTE (A.) . . . La rage en Indo-Chine. . . . . V. 633

CANTANI . . . . . Statistique de Naples. . . . . V. 141
CARITA . . . . . Voir PERRONCITO.
CASSEDEBAT. . . . . Bacilles typhiques et pseudotyphiques . . . . . IV. 625
CAZAL (DU) et VAILLARD. Sur une maladie parasitaire de l'homme, transmissible au lapin. . . . . V. 353
— — — —

GAMALEIA. . . . Rage paralytique chez l'homme. . . . . I. 63
— Vaccination antirabique des animaux. . . . . I. 127 et I. 296
— Lésions rabiques. . . . . I. 165
— . . . . . Vaccinations préventives de la rage. . . . . I. 226
— Prétendues statistiques de la rage. . . . . I. 289
— Destruction des microbes pendant la fièvre . . . . . II. 229
— Étiologie de la pneumonie fibrineuse. . . . . II. 440
— . . . . *Vibrio Metchnikovi*. . . . . II. 482
— Mode d'infection par le V. *Metchnikovi*. . . . . II. 552
— Vaccination charbonneuse. . . . . II. 517
— *Vibrio Metchnikovi*, vaccination chimique. . . . . III. 542
— Id. exaltation de la virulence. . . . . III. 609
— Id. localisation intestinale. . . . . III. 625
— Exaltation de la virulence du bacille morveux. . . . IV. 103
GAYON et DUBOURG. Fermentation de la dextrine. . . . . I 532
GESSARD . . . . . Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique. . IV. 88
— Des races du bacille pyocyanique. . . . . V. 65
— Des races du bacille du lait bleu . . . . . V. 737
GILBERT et LION . . Épanchements pleuraux. . . . . II. 632
GRADENIGO . . . . . Voir MAGGIORA.
GRANCHER et CHANTARD. Action de HFl sur le bacille tuberculeux . . . . . II. 267

H

HAFKINE. . . . . Maladies infectieuses des paramécies. . . . . IV. 148
— Adaptation au milieu chez les infusoires. . . . . IV. 363
HEINISCH. . . . . Propriétés antiseptiques de l'hydroxylamine. . . . . III. 438
HELMAN. . . . . Formes furieuse et paralytique de la rage. . . . . II. 274
— Inoculation du virus rabique. . . . . III. 15
HERMAN. . . . . Coloration du bacille tuberculeux. . . . . III. 160
— Influence du terrain sur les microbes pyogènes. . . V. 243
HÖGYES. . . . . Virus de la rage des rues transmis de lapin à lapin. II. 133
— Étude de quelques questions relatives à la rage. . . III. 429
— Vaccinations antirabiques, avant et après infection. III. 449

I

INSTITUT PASTEUR. . Statistique générale. . . . . I. 30
— Statistique définitive. . . . . I. 308
— Inauguration. . . . . III. 1

K

KAYSER. . . . . Action de la chaleur sur la levure. . . . . III. 513
— Étude sur la fermentation du cidre. . . . . IV. 321
— Études des malts de brasserie . . . . . IV. 484
— Levures alcooliques du lactose. . . . . V. 395
— Sur les ferments de l'ananas. . . . . V. 456
KELSCH et VAILLARD. Tumeurs lymphadéniques multiples avec leucémie . IV. 276
KOSSIAKOFF . . . . . Accommodation aux antiseptiques. . . . . I. 465
KRASILTSCHICK. . . . Nouvelle étuve à pétrole. . . . . III. 166
— Symbiose des pucerons et des bactéries. . . . . III. 465

L

LANNELONGUE et ACHARD. Kystes congénitaux. . . . . IV. 293
— Osteomyélites à staphylocoques et streptocoques. . V. 209
LAURENT . . . . . Polymorphisme du *Cladosporium herbarum*. II. 558 et II. 582
— Nutrition hydro-carbonée de la levure . . . . . III. 113
— Nutrition azotée de la levure. . . . . III. 362
— Variabilité du bacille rouge de Kiel. . . . . IV. 465
— Réduction des nitrates par les végétaux. . . . . IV. 722
— Nodosités radicales des légumineuses. . . . . V. 105
LAVERAN . . . . . Hématozoaires du paludisme. . . . . I. 266
LE DANTEC (Dr). . . Poison des flèches aux Nouvelles-Hébrides. . . . . IV. 716
— Étude de la morue rouge. . . . . V. 656
LE DANTEC (F.). . . Digestion chez les Protozoaires. . . . . IV. 776
— Id. (2e mém.). . . . . V. 163
LEGRAIN . . . . . Cultures sur milieux colorés. . . . . V. 707
LINOSSIER. . . . . Action de SO^2 sur les levures. . . . . V. 170
LOIR . . . . . Vaccination préventive des porcs. . . . . I. 356
— Bacille typhique dans les eaux de Paris. . . . . I. 488
— Voir BRUCE.
LUCET. . . . . Nouvelle septicémie du lapin . . . . . III. 401
— Dysenterie épizootique des poules et dindes. . . . . V. 312

M

MAGGIORA et GRADENIGO. Furoncles du conduit auditif . . . . . V. 651
MACÉ. . . . . Préparation de milieux à la gélose. . . . . I. 189
MALM. . . . . Virulence de la bactéridie charbonneuse. . . . . IV. 520
MALVOZ et BROUWIER Tuberculose bacillaire congénitale. . . . . II. 153
MASSARD et BORDET. Chimiotaxisme des leucocytes. . . . . V. 417
METCHNIKOFF (Mme). Vaccination charbonneuse. . . . . V. 145
METCHNIKOFF. . . . . Atténuation des bactéries charbonneuses. . . . . I. 42
— Sur la phagocytose . . . . . I. 321
— Digestion intracellulaire. . . . . II. 25
— *Pasteuria ramosa*. . . . . II. 165
— Réponse à M. Weigert . . . . . II. 604
— Lettre à M. Duclaux. . . . . II. 610
— Pléomorphisme des bactériens. . . . . III. 61
— Pléomorphisme des bactéries. . . . . III. 265
— Étude sur l'immunité (1er mém.). . . . . III. 289
— Id. (2e mém.) . . . . . IV. 65
— Id. (3e mém.) . . . . . IV. 193
— Id. (4e mém.) . . . . . V. 465
— et ROUDENKO. Accoutumance aux produits microbiens. . . . V. 567
— et ROUX. Propriété bactéricide du sang de rat 479
MEUNIER. . . . . Voir CADÉAC.
MIQUEL. . . . . Dosage des bactéries atmosphériques. . . . . II. 364
MOLLEREAU. . . . . Voir NOCARD.

N

NOCARD. . . . . Mammite des brebis laitières. . . . . I. 417
— Maladie des bœufs de la Guadeloupe. . . . . II. 293
— et MOLLEREAU. Mammite des vaches laitières. . . . . I. 109
— et ROUX. . . Bacille de la tuberculose. . . . . I. 49
— — Charbon symptomatique. . . . . I. 257
— — Vaccination des ruminants contre la rage. . . . . II. 341

P

Pasteur	Lettre sur la rage	I. 1
—	Destruction des lapins en Australie	II. 1
—	Lettre à M. Duclaux	II. 117
Pawlowsky	Bacille tuberculeux sur pommes de terre	II. 303
—	Tuberculose des articulations	III. 526
Perdrix	Action de la bactéridie sur les matières azotées	II. 354
—	Les vaccinations à l'Institut Pasteur	IV. 129
—	Sur le bacille amylozyme	V. 287
—	Les vaccinations anti-rabiques en 1891	V. 344
Péré	Étude des eaux d'Alger	V. 79
Perroncito	Immunité vis-à-vis du charbon	II. 163
— et Carita	Transmission de la rage	I. 177
Peterman	Sur la substance microbicide d'Ogata	V. 506
Poncet	Clou de Gafsa	I. 518
Popoff	Bacille de la fermentation panaire	IV. 674
Protopopoff	Sur la structure des bactéries	V. 332

R

Roudenko	Influence du sang de grenouille chez les souris contre le charbon	V. 515
—	Voir Metchnikoff.	
Roux	Culture des anaérobies	I. 49
—	Conservation des moelles rabiques	I. 87
—	Photographie des microbes	I. 209
—	Action de la chaleur sur les bactéridies	I. 392
—	Virus rabique dans les nerfs	II. 18
—	Cultures sur pomme de terre	II. 28
—	Immunité contre le charbon symptomatique	II. 49
—	Immunité contre la rage	II. 479
—	Virus rabique dans les nerfs	III. 69
—	Bactéridie charbonneuse asporogène	IV. 25
—	Régulateur de température	V. 158
— et Nocard	Culture du bacille de la tuberculose	I. 19
— —	Charbon symptomatique	I. 257
— —	A quel moment la bave devient-elle virulente	IV. 163
— et Chamberland	Vaccination charbonneuse des lapins	I. 513
— —	Immunité contre la septicémie	I. 562
— —	Immunité contre le charbon	II. 405
— et Yersin	Étude sur la diphtérie (1er mém.)	II. 629
— —	Id. (2e mém.)	III. 273
— —	Id. (3e mém.)	IV. 385
Russo-Travali	Voir Blasi (De).	
Ruffer	Destruction des microbes par les cellules amiboïdes	V. 673

S

Sakharoff	Parasite des fièvres paludéennes irrégulières	V. 445
—	La septicémie des oies	V. 564
Sanchez-Toledo	Voir Straus.	
Schaffer	Histologie de la rage	III. 644
—	Sur un cas atypique de rage humaine	IV. 513

SÉLANDER	Étude du Choléra-hog	IV. 545
SOUDAKEWITCH	Sur la fièvre récurrente	V. 545
STRAUS	Anatomie de la pustule maligne	I. 429
—	Absence des microbes dans l'air expiré	II. 181
— et SANCHEZ-TOLEDO	L'utérus après le part physiologique	II. 426
— et WURTZ	Analyse bactériologique de l'air	II. 171
STSCHASTNY	Tuberculose des amygdales	III. 224

T

TCHISTOWISCH	Tuberculose intestinale	III. 209
—	Phagocytose dans les poumons	III. 337
—	Étude sur la pneumonie fibrineuse	IV. 285
—	Extrait d'une lettre à M. Duclaux	IV. 445
—	Étude sur la pneumonie fibrineuse (2e mém.)	V. 450
THOINOT	Examen d'une source calcaire	III. 145
—	Valeur désinfectante de l'acide sulfureux	IV. 500
TRAPEZNIKOFF	Sort des spores dans l'organisme	V 362

V

VAILLARD	Voyez KELSCH.	
— et VINCENT	Sur une pseudo-pelade de nature microbienne	IV. 446
— —	Étude sur le tétanos	V. 1
VERUJSKY	Teigne et favus	I. 369
VESTEA (DI)	Absence des microbes dans les végétaux	II. 670
VIGNAL	Étuve pour cultures	I. 185
—	Culture des anaérobies	I. 358
VINCENT	Bacille typhique dans l'eau de Seine	IV. 772
VIALA	Atténuation des moelles rabiques	V. 695

W

WAGNER	Le charbon des poules	IV. 570
WASSERZUG	Sucrase chez les champignons	I. 525
—	Matière colorante des *bacillus pyocyaneus*	I. 581
—	Variations de forme chez les bactéries	II. 75
—	Variations durables de la forme et de la fonction	II. 153
—	Recherches sur un hyphomycète	II. 207
WIDAL	Voir CHANTEMESSE.	
WINOGRADSKY	Recherches sur les sulfobactéries	III. 49
—	Pléomorphisme des bactéries	III. 249
—	Recherches sur la nitrification (1er mémoire)	IV. 213
—	— — (2e mémoire)	IV 257
—	— — (3e mémoire)	IV. 760
—	— — (4e mémoire)	V. 92
—	— — (5e mémoire)	V. 577
WURTZ	Voir STRAUS.	
WYSOKOWICZ	Lettre à M. Duclaux	III. 327
—	Statistique de Charkow	IV. 603
—	— —	V. 648
YERSIN	Action de la chaleur sur le bacille tuberculeux	II. 60
—	Développement du tubercule expérimental	II. 245
—	Voir ROUX.	

II. — MÉMOIRES ANALYSÉS

A

Adam	Tuberculose à l'abattoir d'Augsbourg	I. 317
Adametz	*Saccharomyces lactis*	III. 201
Ali-Cohen	Sur le *choléra-roth*	I. 507
—	Mouvements propres chez les micrococcus	III. 507
—	La chimiotaxie en bactériologie	IV. 622

B

Banti	Destruction des bactéries dans l'organisme	II. 324
Bauer	Incubation rabique chez l'homme	I. 254
Baumgarten	Spores dans le bacille de la morve	II. 287
Behr	Sur une race incolore de bacilles du lait bleu	V. 60
Behring	Les sels d'argent comme antiseptiques	I. 554
—	Sublimé corrosif dans les liquides albumineux	II. 106
—	Etiologie du charbon	III. 391
Bernheim	Bactéries parasitaires des céréales	II. 621
Bertschinger	Eaux de Zurich	III. 692
Beumer et Peiper	Bacille de la fièvre typhoïde	I. 142
Biondi	Microbes de la salive	I. 363
Blasi (de) et Russo-Travali	Vaccinations antirabiques	III. 270
Bollinger	Transport du charbon par les vers de terre	I. 407
Bordoni-Uffreduzzi	Nouveau microbe pathogène	I. 411
—	Etude biologique de la glace	I. 557
—	Culture des bactéries de la lèpre	II. 89
—	Deux années de cure Pasteur	III. 205
Bordoni et P. Foa	Pneumonie des typhoïques	I. 317
Brieger et Frankel	Sur les poisons des bactéries	IV. 380
Brown	Action chimique du *bacterium aceti*	II. 513
Brunner	Elimination des microbes par la sueur	V. 797
Buchner, Longard et Riedlin	Vitesse de développement des bactéries	I. 409
—	Absorption des microbes par les poumons	II. 281
—	Culture des organismes anaérobies	II. 463
—	Spores du bacille typhique	II. 577
—	Action du sérum sur les bactéries	III. 491
—	Bactéries dans les tissus végétaux	III. 141
Bujwid	Réaction pour les bacilles du charbon	I. 318
—	Virulence du *staphylococcus aureus*	II. 206
Bunge	Fonction des glandes	III. 394
—	Respiration des vers	IV. 190
Butschli	Structure des bactéries	IV. 245

C

Camara Mello-Cabral et Da Rocha	Bacille typhique dans les eaux de Coïmbre	II. 287
Canalis	Désinfection des wagons	III. 98
— et Morpurgo	Influence du jeûne sur la prédisposition	IV. 619
Carnelley et Wilson	Nouvelle méthode bactérioscopique	III. 203
Celli	Quelques propriétés du virus rabique	II. 46

Christmas (de) . . . Immunité et phagocytose. . . . . I. 412
Cope et Horsley . . Epidémie de rage sur les daims. . . . . II. 158
Cornet. . . . . Recherches sur le bacille tuberculeux. . . . . II. 675
Curt Braem. . . . . Dégénérescence des bactéries dans l'eau. . . . . IV. 315
Cygnœus. . . . . Etude sur le bacille typhique . . . . . IV. 382

D

Dal Pozzo. . . . . Culture dans les œufs de vanneau . . . . . II. 463
Darnet. . . . . La rage. . . . . III. 206
Di Mattei. . . . . Transmission de l'immunité de la mère au fœtus . . III. 45
— et Canalis Influence de la putréfaction sur les germes du choléra et du typhus . . . . . IV. 680
Dobroslavine. . . . Alimentation d'eaux à Péterhof . . . . . V. 542
Donitz. . . . . Sur le choléra. . . . . I. 141

E

Ebert et Schimmelbusch. Bactérie du furet. . . . . II. 337
Esmarch . . . . . Cultures sur gélatine . . . . . I. 92

F

Ferran. . . . . Vaccination antirabique de l'homme. . . . . II. 97
— Inoculation de la rage aux lapins. . . . . II. 286
— Vaccinations antirabiques. . . . . III. 206
Finkelstein . . . . . Expériences sur la rage. . . . . II. 576
Fischer . . . . . Recherches bactériologiques . . . . . I. 141 et 319
— Nouveau bacille lumineux . . . . . II. 99
Firtsch . . . . . Variations chez le *vibrio proteus* . . . . . III. 43
Forster . . . . . Action des sels sur les microbes. . . . . III. 490
— Viandes fumées d'animaux tuberculeux . . . . . IV. 319
Frank . . . . . Le charbon. . . . . I. 139
Frankel (A). . . . . Nombre des bactéries dans la glace. . . . . I. 136
Frankel (C.) . . . . Vaccination contre la diphtérie . . . . . V. 146
— Culture des anaérobies . . . . . II. 333
— Action de l'acide carbonique sur les microbes . . . . II. 672
Frankel (C.) et Pfeiffer. Photographie des bactéries. . . . . III. 440

G

Gaffky et Paak. . . Empoisonnement par les viandes . . . . . IV. 801
Galtier . . . . . Persistance de la virulence rabique. . . . . II. 99
Gamaleia. . . . . Etiologie du choléra des poules . . . . . II. 510
Garré . . . . . Antagonisme entre les bactéries . . . . . II. 218
Gebhart . . . . . Virus tuberculeux dilué. . . . . III. 690
Globig . . . . . Bactéries se développant entre 50° et 70°. . . . . II. 102
— Bacille très résistant à la chaleur . . . . . II. 288
Grimm . . . . . Tribromophénol comme antiseptique . . . . . II. 108
Grotenfelt . . . . Sur le lait rouge. . . . . III. 509

H

Hanau . . . . . Inoculation du cancer. . . . . III. 332
Hauser. . . . . Sarcine des poumons. . . . . I. 411

HEIM. . . . . Le café torréfié comme antiseptique . . . . . I. 251
HEUBNER. . . . . État des acides pendant la digestion gastrique . V. 267
HEYDENREICH . . . . Clou de Pendeh. . . . . III. 445
HOGYES. . . . . Prévention de la rage. . . . . II. 94
HOLST . . . . . Traitement du cancer par l'érisypèle . . . . . II. 233
HUEPPE. . . . . Emploi des œufs comme milieu de culture. . . . . II. 463
HUEPPE ET WOOD. . Saprophytisme et parasitisme. . . . . III. 268

I

JADASSOHN. . . . . Sur le rouge de choléra . . . . . II. 44
JANOWSKI . . . . . Richesse de la neige en bactéries. . . . . II. 625

K

KARLINSKI . . . . . Voies de diffusion du charbon. . . . . III. 37
KASTNER . . . . . Viande d'animaux tuberculeux. . . . . III. 486
KITASATO. . . . . Bacille du charbon symptomatique . . . . . III. 331
— Sur le bacille du tétanos . . . . . IV. 61
KITT . . . . . La morve chez la souris des bois. . . . . I. 508
— Le rouget des porcs . . . . . II. 40
— Atténuation du charbon symptomatique . . . . . II. 290
KLEIN . . . . . *Bacillus gallinarum*. . . . . III. 269
— Maladie du grouse d'Écosse . . . . . III. 503
— Entérite infectieuse des poules. . . . . III. 508
KORNER. . . . . Mycosis fongoïde . . . . . I. 204
KRUGER. . . . . Action des dépôts sur les microbes de l'eau . . . . . II. 621
KUHNE . . . . . Technique des colorations. . . . . I. 142
— Coloration des bacilles de la morve. . . . . III. 44

L

LAPLACE . . . . . Sublimé corrosif comme désinfectant. . . . . I. 553
LEGENDRE, BARETTE et LEPAGE. Traité d'antisepsie. . . . . II. 289
LEHMANN. . . . . Spores du charbon. . . . . I. 360
— *Bacterium phosphorescens* de Loeffler . . . . . III. 396
LIBORIUS . . . . . Besoins des bactéries en oxygène. . . . . I. 311
— Action désinfectante de la chaux . . . . . I. 318
LIVON. . . . . Expériences sur la rage . . . . . I. 362
LOEFFLER. . . . . Etiologie de la morve . . . . . I. 137
— Bacille de la diphtérie. . . . . I. 509
— Coloration des microbes. . . . . III. 495
LOIR, GERMOND et HINDS. Le *Cumberland disease* . . . . . II. 511
LOIR et GERMOND. . *Cumberland disease*. . . . . III. 94
LUBBARSCH . . . . . Atténuation de la bactéridie dans la grenouille. . . . II. 160
LUBBERT . . . . . L'acide oxynaphtoïque. . . . . II. 109
LUBIMOFF. . . . . Coloration des bacilles de la lèpre et de la tuberculose. . . . . II. 289
LUDERITZ. . . . . Bactéries anaérobies . . . . . III. 196

M

MALERBA et SANNA SALARIS. Sur la gliscrobactérie. . . . . II. 512
MANFREDI . . . . . Microcoques des tumeurs infectieuses. . . . . I. 205

MANFREDI	Action des corps gras sur les microbes	I. 404
—	Produits de culture du microbe de l'érisypèle	II. 571
MASSART et BORDET	Irritabilité des leucocytes	III. 249
MAXIMOWITCH	Propriétés du naphtol	II. 225
MEADE BOLTON	Bactéries dans l'eau potable	I 200
METCHNIKOFF	Phagocytose dans l'érisypèle	I. 197
—	Phagocytose dans la fièvre récurrente	I. 503
—	Phagocytose dans les cellules géantes du tubercule	I. 505
—	Bactéridies dans l'organisme	III. 41
MONTI	Le bacille typhique et les eaux potables à Pavie	V. 671

N

NENCKI	Les acides lactiques isomères	V. 349
—	Mercaptan dans l'urine humaine	V. 413
NOEGGERATH	Cultures sur milieux colorés	II. 405
NONEWITSCH	Inflammation du foie chez les porcelets	II. 222

O

ORESTE ET ARMANNI	Barbone des buffles	I. 400

P

PANSINI	Action de la lumière sur les microbes	III. 686
PARIETTI	Recherche du bacille typhique	V. 413
PAVONE	Concurrence vitale entre les bacilles	II. 330
PERCY-FRANKLAND	Bactéries dans l'air	I. 315
PFEIFFER et NOCHT	*Vibrio metchnikovi* et le choléra asiatique	IV. 124
—	Vibrions du choléra dans le corps des pigeons	IV. 249
PFUHL	Traitement des cobayes par la tuberculine	V. 729
POELS	Microcoques du *coryza contagione*	II. 42
PROTOPOPOFF	Immunité des chiens contre la rage	II. 462
—	Atténuation du virus rabique	III. 506
PROVE	*Micrococcus ochroleucus*	II. 101
PRUDDEN	Bactéries de la glace	I. 409
—	Action germicide du sang et d'autres liquides	IV. 254

R

RAUDNITZ	Présure dans l'estomac des animaux	I. 414
ROGOWITSCH	Charbon symptomatique	III. 193
ROSENBACH	L'érisypéloïde	I. 461
ROSENTHAL	Microbes dans les tumeurs	III. 140
ROSSIGNOL	Le charbon et la vaccination préventive	II. 398
ROVSING	Iodoforme contre la tuberculose	I. 314

S

SALMON	Le choléra-hog	II. 387
SCHMELCK	Une bactérie de glacier	II. 626
SCHOLL	Sur le poison du choléra	V. 60

SCHOTTELIUS. . . . . *Micrococcus prodigiosus*. . . . . I. 459
SERAFINI. . . . . Pneumonie fibrineuse. . . . . I. 500
SEYDEL. . . . . Gangrène septique après lésion sous-cutanée. . . . . II. 220
SIROTININ. . . . . Inoculation de la fièvre typhoïde. . . . . I. 141
SOUDAKEWITCH. . . . Fibres élastiques et cellules géantes. . . . . III. 136
SPINA. . . . . Décoloration des bactéries. . . . . I. 506
STERN. . . . . Action de la ventilation sur les microbes . . . . III. 616
STERNBERG. . . . . Prophylaxie de la fièvre jaune. . . . . IV. 253
— Étiologie de la fièvre jaune . . . . . V. 796
STSCHASTNY. . . . . Relations des cellules avec les bacilles tuberculeux. III. 93

T

TASSINARI . . . . . Action de la fumée de tabac sur les microbes . . . . II. 579
THIN . . . . . Inoculation du tissu lépreux. . . . . I. 254
TILANUS . . . . . L'iodoforme est-il un antiseptique?. . . . . I. 253

U

UHLIG . . . . . Alimentation des nourrissons. . . . . III. 570

V

VESTEA (DI) et ZAGARI Sur la rage. . . . . I. 492
VINCENZI. . . . . Injection des bacilles-virgules . . . . . I. 508
VOELSCH . . . . . Résistance des bacilles tuberculeux . . . . . II. 38
VOIT . . . . . Formation du gras de cadavre. . . . . II. 460
VON BESSER. . . . . Bactéries des voies aériennes. . . . . IV. 57

W

WAHL. . . . . Inoculation de la tuberculose . . . . . I. 318
WATSON-CHEYNE. . . Étude sur l'infection . . . . . I. 47
WEISSER et FRANK. Intestin des cholériques. . . . . I. 140
WINOGRADSKY . . . . Bactéries des eaux sulfureuses . . . . . I. 548
— Sur les bactéries ferrugineuses. . . . . II. 321
WOLF. . . . . Transmission héréditaire des maladies infectieuses. II. 317
WOLFHUGEL et RIEDEL Multiplication des bactéries dans l'eau. . . . . I. 203
WYSSOKOWITCH. . . Microorganismes dans le sang. . . . . I. 45
— Vaccinations charbonneuses. . . . . III. 137

Z

ZAGARI. . . . . Transmission de la rage de la mère au fœtus. . . . . II. 92
ZARNIKO . . . . . Bacille diphtéritique . . . . . III. 505
ZOEROS PACHA. . . . Vaccinations antirabiques. . . . . III. 271

REVUES CRITIQUES

ALCOOL (L') est-il un aliment? . . . . . IV. 745
ANTISEPTIQUES (Sur la question des). . . . . III. 671
— de la série aromatique. . . . . V. 617
BACTÉRICIDE (Propriété) des humeurs. . . . . III. 664

Carcinome et sarcome . . . . . II. 84
Digestion (Diastases de la). — Sucrase . . . . . II. 613
— des matières grasses . . . . . III. 126
— gastrique, dosage des acides libres . . . . . III. 483
— dans l'intestin grêle . . . . . V. 406
Eaux (Rôle des) dans le transport des bactéries dans le sol . . . . . I. 134
— (Filtrage des) . . . . . IV. 41
— Action sur les bactéries pathogènes . . . . . IV. 109
— Relations avec les sols qu'elles traversent . . . . . IV. 172
— L'École de Munich et l'École de Berlin . . . . . IV. 299
— (Filtrage des) de fleuve . . . . . V. 257
Électricité. Action sur les microbes . . . . . IV. 617
Hématozoaires du paludisme . . . . . II. 377
Immunité (Sur les théories de l') . . . . . II. 494
— acquise et immunité naturelle . . . . . V. 517
Inhalation (Absorption par) des germes morbides . . . . . II. 32
Iodoforme (Sur la valeur de l') comme antiseptique . . . . . I. 597
Lait (Vitalité de divers microbes dans le) . . . . . IV. 185
— (Sur la stérilisation du) . . . . . V. 50
— (Procédés de conservation) . . . . . III. 30
Lumière (Action de la) sur les microbes . . . . . I. 88
— — — . . . . . IV. 697
Matières albuminoides (Les) . . . . . V. 712
— (Constitutions des) . . . . . V.
Microbes du sol . . . . . I. 246
— phosphorescents . . . . . I. 489
— des nodosités des légumineuses . . . . . III. 82
— des eaux . . . . . III. 559
— (Passage des) de la mère au fœtus . . . . . III. 188
Morve et immunité morveuse . . . . . IV. 459
Oxydation dans le sol . . . . . III. 500
Phagocytes (sur la théorie des) . . . . . IV. 35
— (La théorie des) au Congrès de Londres . . . . . V. 534
Staphylococcus aureus (Sort du) sous la peau . . . . . III. 133
Sécrétion des diastases dans l'orge . . . . . IV. 607
Sol (Actions microbiennes dans le) . . . . . IV. 232
Tuberculine (La) . . . . . V. 184
— . . . . . V. 722
Tumeurs infectieuses (Sur un microbe pathogène de certaines) . . . . . I. 195

TABLE ANALYTIQUE DES MATIÈRES

DES TOMES I A V

A

Absorption par inhalation des germes morbides, II, 32, 281.
Accommodation aux antiseptiques, I, 465 ; — au milieu chez les infusoires et les bactéries, IV, 363.
Accoutumance aux produits microbiens, V, 567.
Acétification. Action du *Bacterium aceti*, II, 513.
Action bactéricide du sérum, III, 491 ; — des humeurs, III, 664 ; — du sérum et des humeurs, IV, 254 ; — du sang de rat, V, 479 ; — du sérum et des organes, V, 487 ; — du sang, V, 506 ; — du sang de grenouille, V, 515.
Albuminoides (matières). Étude critique, V, 712.
Alcool. Est-il un aliment? IV, 745.
Alcools supérieurs. Recherche, II, 488.
Anaérobies. Méthodes de culture, I, 49, 358 ; II, 333, 464 ; III, 196.
Analyse bactériologique de l'air, II, 170, 364; III, 293; — de l'air expiré, II, 181 ; — des conserves alimentaires, II, 279 ; — de la cavité utérine après le part, II, 426 ; — des tissus végétaux, II, 567, 621, 670; III, 141 ; — de la neige, II, 625 ; — des épanchements pleuraux, II, 662 ; — de l'air et des parois des salles de phtisiques, II, 676 ; — d'une source de la région du Havre, III, 145; — des voies aériennes, IV, 57; — de la sueur, V, 797.
Ananas. Ferments de l'ananas, V, 456.
Antagonisme des bactéries, II, 200, 218 ; — des bacilles du typhus et du charbon, II, 330 ; — des bacilles du charbon et du pus bleu, IV, 689.
Antiseptiques. Etude générale, III, 671 ; — Essences, I, 153; III, 316; — Café torréfié, I, 251 ; — Iodoforme, I, 253, 314, 597; — Chaux, I, 318 ; — Solutions d'argent, I, 554 ; — Acide oxynaphtoïque, II. 109 ; — Naphtol, II, 225; — Fumée de tabac, II, 579 ; — Hydroxylamine, III, 438 ; — Acide carbonique, III, 672 ; — Sel marin, III, 490 ; — Acide sulfureux, IV, 500; V, 171 ; — Corps de la série aromatique, V, 617 ; — Sublimé corrosif, I, 553 ; II, 106 ; — Tribromophénol, II, 108 ; — Accommodation aux antiseptiques, I, 465.
Australie. Destruction des lapins, II, 1 ; — maladies du bétail, V, 177.

B

Bacille amylozyme, V, 286 ; — rouge de Kiel, sa variabilité, IV, 465.
Bacillus *pyocyaneus*, I, 581 ; IV, 88 ; V, 60, 65 ; — *gallinarum*, III, 269; — *cyanogenus*, V, 737.
Bactérie du furet, II, 336.
Bactéries. Variations de forme, II, 74 ; — variations durables de la forme et de la fonction, II, 153 ; — structure, IV, 245 ; V, 332 ; — se développant entre 50° et 70°, II, 102, 288.
Barbone des buffles, I, 400.
Beri-beri. Anatomie et histologie, I, 610.
Bouton du Nil, I, 477 ; — de Gafsa, I, 518 ; — de Pendeh, III, 445.

C

Carcinome et sarcôme, II, 84 ; — traitement par l'érysipèle, II, 223 ; — présence des microbes, III, 140 ; — inoculation réussie, III, 332.
Charbon, *étiologie*. Culture de la bactéridie dans le sol, I, 139 ; — formation des spores, I, 360 ; — action de divers agents sur les spores, I, 392, 445, 594 ; — bactéridie asporogène, IV, 25 ; — rôle des vers de terre, I, 407 ; — atténuation, I, 42 ; II, 160 ; — action sur les matières azotées, II, 354 ; — anatomie pathologique de la pustule, I, 429 ; — traitement, I, 605 ; — voie de diffusion, III, 37 ; — Immunité des rats blancs, III, 39 ; — de divers animaux, III, 163 ; — Étiologie, III, 391 ; — passage chez le chien et le lapin, IV, 520 ; — chez les poules, IV, 570 ; — traitement par le bicarbonate de soude, V, 337 ; — sort des spores inoculées, V. 332.
Voir aussi Phagocytose.
Charbon, *vaccination*. Résultats pratiques, I, 301 ; — vacc. des lapins, I, 513 ; — expériences de Melun, II, 398 ; — immunité conférée par des substances chimiques, II, 405 ; — études sur la vaccination, II, 517 ; III, 327 ; V, 145 ; — vaccination en Russie, III, 137.
Charbon symptomatique, *étiologie*, I, 257 ; II, 290 ; III, 193, 331 ; — *vaccination* en Suisse, III, 207.
Chimiotaxie, IV, 250, 346, 622 ; — et infection, V, 417.
Choléra. Intestin des cholériques, I, 140 ; — contagion par les objets matériels, I, 141 ; — réaction chimique des bacilles, I, 318, 507 ; II, 30, 44 ; — injections du bacille chez le cobaye, I, 508 ; — inoculation au pigeon, IV, 249.
Choléra des poules, *étiologie*, II, 510.
Choléra-hog, II, 387 ; IV, 545.
Cidre (Fermentation du), IV, 321.
Conservation des microbes, III, 78 ; — de la levure, III, 375.
Coryza contagiosa (Microcoques du), II, 42.
Cumberland disease, II, 511 ; III, 94.

D

Dégénérescence des bactéries dans l'eau distillée, IV, 315.
Dépôts. Leur influence sur les germes en suspension dans l'eau, III, 621.
Désinfection des wagons, III, 198.
Destruction des lapins en Australie, II, 1.
Destruction des microbes dans les organismes fébricitants, II, 229 ; — des bactéries dans l'organisme, II, 324.
Dextrine (Fermentation de la), I, 532.
Diastase. *Amylase*. Son affaiblissement sous l'action de la chaleur, I, 337 ; — amylase de l'urine, III, 304 ; — sa sécrétion dans l'orge, IV, 607 ; — *Présure* dans l'estomac des nourrissons, I, 414 ; — *Sucrase* chez quelques champignons, I, 525 ; — dans le canal intestinal, II, 613 ; — dosage, III, 473, 531 ; — sucrase chez l'*aspergillus niger*, IV, 1 ; — chez la levure, IV, 641.
Digestion des matières grasses, III, 126 ; — dosage des acides libres du suc gastrique, III, 182 ; — état des acides du suc gastrique des nourrissons, V, 267 ; — dans l'intestin grêle, V, 406.
Digestion *intracellulaire*, III, 25 ; — chez les protozoaires, IV, 776 ; V, 163.
Diphtérie. Recherches de Lœffler, I, 509 ; — de Roux et Yersin, II, 629 ; III, 273 ; IV, 385 ; — sur le bacille, III, 505 ; — vaccination, V, 140.
Dose. Influence de la dose de microbes sur les résultats de l'inoculation, I, 47.
Dysenterie épizootique des poules et des dindes, V, 312.

E

Eau. Action sur diverses bactéries, I, 200, 203 ; — les microbes des eaux, III, 559 ; — action sur les bactéries pathogènes, IV, 109 ; — oscillations des eaux pro-

fondes, I, 434; III, 559; — eau des sources des régions calcaires, III, 145; — eaux d'Alger, V, 79. Voir aussi SOL.
EAUX FERRUGINEUSES. Bactéries, II, 321.
EAUX SULFUREUSES. Bactéries, I, 548; III, 49.
ÉLECTRICITÉ. Action sur les microbes, IV, 677.
ENTÉRITE infectieuse des poules, III, 508.
ÉRYSIPÈLE. Action des produits de culture de son microbe, II, 571.
ÉRYSIPÉLOÏDE, *étiologie*, I, 481.
ÉTUVES de M. Vignal, I, 185; — de M. Krassiltschick, III, 166; — de M. Roux, V, 158.

F

FARCIN des bœufs de la Guadeloupe, II, 293.
FERMENTATION PANAIRE, IV, 674.
FIÈVRE JAUNE. Rapport sur les résultats des vaccinations, IV, 253; — étiologie, V, 796.
FIÈVRE RÉCURRENTE chez le singe, V, 545.
FIÈVRE TYPHOÏDE. Inoculation aux animaux, I, 141; IV, 182; — étiologie, I, 142; — bacille typhique dans les eaux de Paris, I, 488; — de la Seine, IV, 772; — de Coïmbre, II, 287; — d'Alger, V, 78; — de Pavie, V, 671; — spores du bacille, II, 577; — bacilles typhiques et pseudo-typhiques, IV, 625; — sa recherche dans les eaux, V, 413.
FILTRAGE de l'eau, IV, 41; — des eaux de fleuve, V, 257.
FER. Son origine chez le nourrisson, III, 394.
FURONCLES du conduit auditif externe, V, 659.

G

GANGRÈNE septique après une lésion sous-cutanée, II, 220.
GLACE (bactéries de la), I, 136, 409; — leurs relations avec la santé publique, I, 557; — une bactérie de glacier, II, 626.
GLANDES. Sur leur fonction, III, 394.
GLISCROBACTÉRIE (Recherches sur la), II, 512.
GRAS DE CADAVRE. Recherches sur sa formation, II, 460.
GRÊLE (Bactéries trouvées dans la), I, 592.
GROUSE D'ÉCOSSE (Maladie infectieuse du), III, 503.

H

HÉMATOZOAIRES du Paludisme, I, 266; II, 377; — leur développement dans les leucocytes des oiseaux, IV, 426; — parasitologie du sang, IV, 440; — de la malaria aiguë et chronique, IV, 753; — des fièvres paludéennes irrégulières, V, 445; — microbiose malarique, V, 758.
HYPHOMYCÈTE (Recherches morphologiques et physiologiques sur un), II, 207.

I

IMMUNITÉ. Sur son mécanisme, II, 66; — théories diverses, II, 495, 610; — Immunité acquise et immunité naturelle, V, 517.
IMMUNITÉ conférée par des produits solubles contre la septicémie, I, 561; — contre le charbon symptomatique, II, 49; — contre le virus de la fièvre typhoïde, II, 54; — contre le charbon, II, 405; — contre la diphtérie, V, 140.
IMMUNITÉ. Recherches de M. Metchnikoff, III, 289, IV, 65; 193; V, 465.

INFECTIONS dans la vie embryonnaire, I, 607 ; II, 121, 317, 426 ; III, 45, 188.
INSTITUT PASTEUR. Inauguration, II, appendice ; — description, III, 1 ; — meeting de Mansion-House, III, 308.

J

JEUNE. Son influence sur la prédisposition aux infections, IV, 619.

L

LACTIQUES, acides isomères, V, 349.
LACTOSE. Fermentation alcoolique, I, 572; III, 201; V, 395.
LAIT. Agent de transmission de la scarlatine, I, 453 ; — procédés de conservation, III, 30; V, 50; — sur le lait rouge, III, 509 ; — lait stérilisé, III, 570; — vitalité des microbes pathogènes dans le lait, IV, 185; — agent de transmission de la tuberculose, IV, 682; — lait bleu, V, 737.
LÉGUMINEUSES. Microbes des nodosités, III, 82; V, 104.
LÈPRE. Culture des bacilles, II, 89.
LEUCOCYTOZOAIRES des oiseaux, IV, 426; V, 758.
LEVURE DE BIÈRE. Nutrition hydrocarbonée, III, 113; — azotée, III, 332; — conservation de la L., III, 375; — action de la chaleur, III, 513 ; — formation des spores, III, 556.
LUMIÈRE. Action sur les microbes, I, 88; III, 686; IV, 792

M

MALADIE parasitaire de l'homme transmissible au lapin, V. 353.
MALTS de brasserie, leur étude, IV, 484.
MAMMITE des vaches laitières, I, 109; — des brebis laitières, I, 417.
MATIÈRES GRASSES. Leur migration, I, 347.
MÉTHODES DE CULTURE. Méthode d'Esmarch, I, 92 ; — préparation des milieux à la gélose, I, 189; — cultures sur milieux colorés, I, 410; II, 105; V, 707; — sur pomme de terre, II, 28; — dans les œufs, II, 463.
MÉTHODES DE COLORATION par le tannin, I, 506 ; — des bactéries de la morve, III, 44; — du bacille tuberculeux, III, 160; — des bactéries et de leurs cils, III, 495.
MÉTHYLMERCAPTAN dans l'urine, V, 413.
MICROBES. Sort des M. injectés dans le sang, I, 45; — phénomènes généraux de leur vie I, 145; — leurs besoins en oxygène, I, 311; — atténuation en présence des corps gras, I, 404; — vitesse de développement, I, 406.
MICROBES phosphorescents, I, 489
MICROBES. Leur étude par la photographie, I, 209; III, 441.
MICROCOCCUS. Mouvement propres chez eux, III, 507.
MICROCOCCUS OBLONGUS. Son action sur le glucose, II, 309.
MICROCOCCUS OCHROLEUCUS, II, 101.
MICROCOCCUS PRODIGIOSUS. Biologie, I, 459.
MORUE ROUGE (Étude sur la), V 636.
MORVE. Étiologie, I, 137; — chez la souris des bois, I, 508; — formation des spores dans le bacille, II, 287 ; — coloration des bacilles, III, 44; — exaltation de la virulence, IV, 103; — morve et immunité morveuse, IV, 459.
MYCOSIS FONGOÏDE, I, 204.

N

NITRATES. Leur réduction par les végétaux, IV, 722.
NITRIFICATION. Recherches de M. Winogradsky, IV, 213, 257, 760; V, 92, 577.

Nutrition intracellulaire, III, 97. 413; — nutrition hydrocarbonée et azotée de la levure de bière, III, 113.

O

Ostéomyélytes à streptocoques, V. 209.

P

Paludisme. Hématozoaires, I, 166; II, 377.
Paramécies (Maladie infectieuse des), IV, 148.
Parasitisme et saprophytisme, III, 268,
Pasteuria ramosa. Bactérie à division longitudinale, II, 165.
Pelade. Sur un pseudo-pelade de nature microbienne, V, 446.
Phagocytose. Exposé général, I, 321, 412; — dans l'érysipèle, I, 197; — dans la fièvre récurrente, I, 503; — dans la tuberculose, II, 505, 604; III, 224; — dans le charbon, III, 41; IV, 570; — dans le charbon symptomatique, V, 673; — dans les néoplasies cutanées, III, 136; — dans le rouget, III, 289; — dans le poumon, III, 337; dans la morve, — IV, 459; — discussion des travaux opposés, IV, 35, 432; V, 534.
Phosphorescence. Microbes qui la produisent, I, 489; — bacille de Fischer, II, 99; III, 396.
Polymorphisme du *Cladosporium herbarum*, II, 558, 581; — des bactéries, III, 61, 248, 265.
Pneumonie. Causes de la fièvre, I, 500; — fibrineuse, II, 440; IV, 285; V, 450; — des typhoïques, I, 317.
Pus. Voir Suppuration.
Putréfaction. Son influence sur les germes du choléra et du typhus, IV, 680.

R

Rage. *Étiologie.* Lettre de M. Pasteur, I, 1; — rage paralytique chez l'homme, I, 62; — incubation, I, 154; — fièvre dans l'incubation, II, 374; — mortalité, I, 289; — passage du virus dans le lait, I, 180, 182; — Transmission au fœtus, I, 177, 181; II, 92; — lésions, I, 165; — propriétés du virus, II, 46, 99, 119, 362; III, 429; IV, 163; — atténuation du virus, III, 506; IV, 684; V, 625, 695; — virus rabique dans les nerfs, II, 18; III, 68, 237; — transmission de lapin à lapin, II, 133, 274, 286; III, 449; — pathologie et histologie, III, 644; — étude séméiologique et pathogénique, II, 187; III, 609; — épidémie sur les daims, II, 158; III, 658; — immunité des chiens, II, 462, 479; — des divers animaux, III, 15; — cas atypique de rage, IV, 512; — questions variées, II, 576; III, 429.
Rage. *Vaccination*, I, 127; III, 226, 296, 384; — des chiens, I, 84; — des ruminants, II, 341; — nouvelle méthode de vaccination, II, 94, 97; V. 632; — la rage en Indo-Chine, V, 633.
Rage. Voir en outre Statistique.
Rate. Son rôle dans les maladies infectieuses, III, 577; IV, 40.
Rouget. Étiologie, II, 40; — phagocytose, III, 289; — vaccinations préventives, I, 356; — immunité, III, 289.

S

Salive (Microbes de la), I, 363.
Sarcine des poumons, I, 411.
Scarlatine transmise par le lait, I, 453.

Septicémie (Sur une nouvelle) du lapin, III, 401.
Septicémie hémorragique, V, 673.
Sol (Microbes du), I, 247, 496; — phénomènes d'oxydation dans le sol, III, 500; — les relations avec l'eau qui le traverse, IV, 172; — actions chimiques et microbiennes qui s'y produisent, IV, 232; — l'École de Munich et l'École de Berlin, IV, 299.
Statistiques du traitement antiarabique, Institut Pasteur, I, 30, 94, 308; IV, 129; V, 344; — Institut de Buenos-Ayres, III, 206; — de Barcelone, III, 206; — de Charkow, IV, 603; V, 649; — de Constantinople, III, 271; — de Naples, V, 143; — de Palerme, III, 270; V. 646; — de Tiflis, III, 574; — de Turin, III, V, 642; — de Varsovie, I, 241; III, 177; V, 710.
Staphylococcus, Streptococcus. Voir Suppuration, Ostéomyélites.
Sulfobactéries. Recherches sur les sulfobactéries, III, 49.
Suppuration. Recherches expérimentales, II, 469; — influence du sucre, II, 626; — sort du *Staphylococcus aureus* sous la peau, III, 133; — influence du terrain organique sur les microbes de la suppuration, V, 243; — ostéomyélites, V, 209.
Symbiose de pucerons avec des bactéries, III, 465.

T

Teigne. Recherches sur l'A. *Schonleinii* et le T. *tonsurans*, I, 369.
Terrain organique. Son influence sur les microbes pyogènes, V. 243.
Tétanos. Sur le bacille du Tétanos, IV, 61; — poison des flèches des naturels des Nouvelles-Hébrides, IV, 716; — études sur le Tétanos, V, 1.
Toxisne des bactéries, IV, 380; — empoisonnement par le saucisson et la viande, IV, 801; — du choléra, V, 60.
Transmission intraplacentaire des microbes, II, 121, 317, 426; III, 45, 188; — de la tuberculose, III, 153.
Tuberculine. Revues, V, 184.
Tuberculose. Culture du bacille, I, 19; — différenciation avec la scrofulose, I, 191; — fréquence à l'abattoir d'Augsbourg, I, 317; — un cas d'inoculation, I, 318; — Résistance des bacilles, II, 38, 60, 267; — Tubercule expérimental, II, 245; — culture du bacille sur pomme de terre, II, 303; — essais de traitement, II, 675; — relations du bacille avec les cellules, III, 93; — T. bacillaire congénitale, III, 153; — coloration du bacille, III, 140; — Tuberculose intestinale, III, 209; — T. des amygdales et de l'épiglotte, III, 224; — des articulations, III, 526; — influence de la dilution du virus, III, 690.
Tuberculose transmise par la viande, III, 486; — infectiosité des viandes fumées, IV, 319.
Tuberculose *zoogléique*, I, 97.
Tumeurs infectieuses. Étiologie, I, 195, 205; — présence des microbes, III, 140.
Tumeurs lymphadéniques avec leucémie, IV, 276.

V

Ventilation. Son influence sur les microbes en suspension dans l'air, III, 616.
Vers (Respiration des), IV, 190.
Vibrio metchnikovi, II, 482, 552; — vaccination chimique, III, 542; — exaltation de sa virulence, III, 609; — localisation intestinale, III, 625; — ses rapports avec le choléra asiatique, IV, 124.
Vibrio proteus. Phénomènes de variation, III, 43.

FIN

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

MBL/WHOI LIBRARY
WH 1ACD %